

**Zeitabhängige Veränderungen der
Succinatdehydrogenase und NAD-Diaphorase
und Postmortale Altersbestimmung gedeckter
Hirnrindenverletzungen**

Thomas Gilg

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551927_0086

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. W. Spann

Zeitabhängige Veränderungen der
Succinatdehydrogenase und NAD-Diaphorase
und Postmortale Altersbestimmung gedeckter
Hirnrindenverletzungen.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Thomas G i l g
aus
München
1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Dr. med. habil. W. Eisenmenger

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 8. 5. 1979



Inhaltsverzeichnis

A. EINLEITUNG

1. Problemstellung

1.0.1. Auswahl der Enzyme

1.0.2. Juristische und rechtsmedizinische Aspekte

1.0.3. Zielsetzung

1.0.4. Medizinische Bedeutung von Schädelhirntraumen

1.1. Rechtsmedizinische Bedeutung der Altersbestimmung von Hirnverletzungen

1.1.1. Vitalität von Verletzungen, speziell Hirnverletzungen

1.1.2. Histologische Routinemethoden

1.1.3. Pathomechanik und Pathomorphologie von Rindenprellungsherden

1.2. Histologische Beurteilungskriterien und bisherige Ergebnisse

1.2.1. Stadium I - Frühe Veränderungen

1.2.2. Stadium II

1.2.3. Histochemie bei forensischen Problemen

B. MATERIAL UND METHODE

2. Historisches und Allgemeines zur Enzymhistochemie

2.1.0. Forderungen an die Methodik

2.1.1. Reaktionsprinzipien

2.2. Nachweis und Stellung der Enzyme im Stoffwechsel

2.2.1. SDH

2.2.2. NADD

2.2.3. Kontrollreaktionen und Parallelschnitte

2.3. Material

2.3.1. Entnahmekriterien

2.3.2. Häufigkeitsverteilung

- 2.3.3. Gewebsentnahme und Verarbeitung
- 2.3.4. Einfluß der postmortalen Liegedauer
- 2.3.5. Einfrieren
- 2.3.6. Schneiden

C. E R G E B N I S S E u n d B E F U N D E

3.1. SDH Normalbefund

- 3.1.1. Allgemeine Prinzipien der Schädigungsmuster
- 3.1.2. Bisherige Befunde nach hypoxämischer Schädigung
- 3.1.3. Nach mechanischer und thermischer Schädigung

3.2. Eigene Befunde - Einteilung in Gruppen

- 3.2.0.1. Gruppe 1 : sofortiger Tod
- 3.2.0.2. Gruppe 2 : - 1 h Überlebenszeit
- 3.2.0.3. Gruppe 3 : 1 - 2 h
- 3.2.0.4. Gruppe 4 : 2 - 4 h
- 3.2.0.5. Gruppe 5 : 4 - 6 h
- 3.2.0.6. Gruppe 6 : 6 - 13 h
- 3.2.0.7. Gruppe 7 : 13 - 24 h
- 3.2.1.0. Gruppe 8 : 1 - 2 d
- 3.2.1.1. Gruppe 9 : 2 - 4 d
- 3.2.1.2. Gruppe 10 : 4 - 6 d
- 3.2.1.3. Gruppe 11 : 6 - 15 d
- 3.2.1.4. Gruppe 12 : über 15 d Überlebenszeit

3.3. NADD Normalbefund

- 3.3.1. Bisherige Befunde nach Ischämie
- 3.3.2. Nach chronischer Hypoxämie und akuter Ischämie
- 3.3.3. Nach mechanischer und thermischer Schädigung

3.4. Eigene Befunde

- 3.4.1. Gruppe 1 : sofortiger Tod
- 3.4.2. Gruppe 2 : Überlebenszeit - 1 h
- 3.4.3. Gruppe 3 : 1 - 2 h
- 3.4.4. Gruppe 4 : 2 - 4 h
- 3.4.5. Gruppe 5 : 4 - 6 h
- 3.4.6. Gruppe 6 : 6 - 13 h

- 3.4.7. Gruppe 7 : 13 - 24 h
- 3.4.8. Gruppe 8 : 1 - 2 d
- 3.4.9. Gruppe 9 : 2 - 4 d
- 3.4.1.1. Gruppe 10 : 4 - 6 d
- 3.4.1.2. Gruppe 11 : 6 - 15 d
- 3.4.1.3. Gruppe 12 : über 15 d Überlebenszeit

D. ZUSAMMENFASSUNG und DISKUSSION

- 4. Problemstellung der Untersuchungen unter dem speziellen Aspekt der zeitlichen Grenzwertbestimmung
 - 4.1. Überlegungen zur Anwendung der Enzymhistochemie
 - 4.2. Veränderungen bei Darstellung der SDH-Zusammenfassung
 - 4.3. Veränderungen bei Darstellung der NADD-Zusammenfassung
 - 4.4. Vergleich und Abschätzung der Möglichkeiten der histochemischen Darstellung der SDH und NADD und anderer Enzyme mit histologischen Methoden
 - 4.5. Schlußfolgerungen für die praktische Anwendung

Anhang: Tabellen

Literaturverzeichnis

A. EINLEITUNG

1. Im Rahmen einer größeren Übersichtsarbeit über die postmortale Altersbestimmung von Hirnverletzungen bei forensischen Fragestellungen sollten Untersuchungen an Rindenprellungsherden bei gedeckten Schädel-Hirntraumen anhand enzymhistochemischer Methoden durchgeführt werden.

Dabei wurden, neben histologischen Veränderungen, Aktivitätsänderungen von 6 Enzymen postmortal bei entsprechenden Verletzungen und bekannter Überlebenszeit untersucht.

1.0.1. Ausgewählt wurden auf Grund ähnlicher Untersuchungen an Haut- und Verbrennungswunden durch RAEKALLIO (27) und PIOCH (26) und auf Grund allgemeiner Überlegungen zur Pathophysiologie, Pathobiochemie und Neuropathologie folgende Enzyme: Succinatdehydrogenase (SDH), NAD-Diaphorase (NADD), Lactatdehydrogenase (LDH), unspezifische Esterasen (uE), saure Phosphatase (sPh) und alkalische Phosphatase (aPh). Davon wurden je 2, nämlich SDH und NADD, LDH und uE, sPh und aPh an Serienschnitten, aber getrennt und unabhängig voneinander in Einzelarbeiten untersucht, in dieser Arbeit SDH und NADD.

1.0.2. Dabei sollten Gesichtspunkte der juristischen Beweisforderungen bezüglich Reproduzierbarkeit und Exaktheit der Veränderungen und der Sicherheit der Aussage berücksichtigt werden, aber auch bezüglich der Praktikabilität für die Rechtsmedizin. Es sollten Methoden zur Anwendung kommen, die ohne zu großen apparativen Aufwand durchführbar sind und damit praktisch für jedes rechtsmedizinische Institut in Deutschland anwendbar. Dies trifft auf jeden Fall für die histologischen Routinefärbungen am ZNS zu wie beispielsweise die Färbung nach Nissl, Klüver-Barrera, Weigert, HE-Färbungen und ähnliches. Elektronenmikroskopie oder Rasterelektronenmikroskopie beispielsweise wären schon zu aufwendig im Routinebetrieb und werden praktisch an keinem Rechtsmed. Institut in Deutschland routinemäßig durchgeführt. Die Histochemie wäre jedoch praktikabel, da

neben der speziellen Färbetechnik und Gewebsbehandlung nur eine Anlage zur Herstellung von Gefrierschnitten notwendig ist, die weitere Auswertung am Mikroskop erfolgen kann. Auch wurden enzymhistochemische Untersuchungen an Haut- und Verbrennungswunden bereits von RAEKALLIO (27) und PIOCH (26) auf forensischem Gebiet praktiziert.

1.0.3. Anhand eines zusammenfassenden Schemas von histochem. wie auch histologischen Veränderungen sollte dann eine Beurteilung des Alters und der Vitalität von gedeckten Hirnverletzungen postmortal ermöglicht werden, um dann bei unbekannten Überlebenszeiten retrospektiv im zeitlichen Längsschnitt eine Bestimmung der Überlebenszeit beziehungsweise des Alters der Verletzungen zu ermöglichen.

1.0.4. Die Beurteilung gerade von Schädel-Hirntraumen für die Überlebenszeit ist nicht zuletzt auf Grund des erheblichen Anteils schwerer Hirnverletzungen bei Verkehrsunfällen von großer Bedeutung. Der Anteil von Schädel-Hirnverletzungen an der Gesamtzahl der Verletzungen beträgt nach Angaben verschiedener Autoren (SPITZER u.a.) zwischen 33,6 und 38,5 %. Das bedeutet, daß auf 330943 Verkehrsunfälle mit Personenschäden, die sich 1974 in der BRD ereigneten, ca. 150 000 Schädel-Hirnverletzungen, davon rund 40 000 mittelschwere und schwerere kommen. Dabei wurden 14 590 Menschen getötet, wobei auch hier die Schädel-Hirnverletzungen eine dominierende Rolle spielen.

1.1. Diese erhebliche Anzahl von Schädel-Hirntraumen bei Verkehrsunfällen ist nicht nur für den Arzt im allgemeinen, sondern insbesondere für den Rechtsmediziner von erheblicher Bedeutung, da dieser oft zur Klärung versicherungsrechtlicher, zivilrechtlicher, sozialrechtlicher wie auch strafrechtlicher Fragen beitragen muß. Hinzu kommen noch zahlreiche Arbeitsunfälle, Suizide und vor allem fahrlässige oder vorsätzliche Verletzungen mit Todesfolge, wobei auch hier Schädel-Hirnverletzungen in hohem Maße beteiligt sind.

Die Bestimmung der zeitlichen Folge von Verletzungen, die vitale Reaktion und die Frage nach der den Tod letztlich verursachenden Gewalteinwirkung sind dabei zentrale Probleme der forensischen Medizin.

Die Frage, ob ein noch lebender Mensch von der Eisenbahn überfahren wurde, was einem Selbstmord entsprechen könnte, oder ob eine Leiche vom Täter zur Verdeckung einer Straftat und Vortäuschung eines Selbstmordes auf die Schienen gelegt wurde oder ob eine noch lebende aber bewußtlose Person auf den Schienen lag und dann überfahren wurde, ist natürlich von großer Wichtigkeit für den Rechtsmediziner. Auch bei zeitlich getrennter Gewalteinwirkung gegen den Schädel mit sekundären Schädigungsfolgen wie z.B. einer Epilepsie ist von Bedeutung, welches Trauma einen bleibenden Schaden verursacht hat.

Ebenso hat die Frage, ob ein erneuter Schlag auf den Schädel in bestimmtem Zeitintervall einen tief bewußtlosen oder einen schon toten Menschen trifft, eventuell weitreichende juristische Konsequenzen.

1.1.1. Diese Frage der Vitalität einer Verletzung, hier speziell einer Hirnverletzung gehört zu den bedeutendsten Problemen der Rechtsmedizin, insbesondere nachdem die früher vertretene Auffassung, daß Blutungen im ZNS immer vitale Reaktionszeichen darstellen, durch die Untersuchungen von NAEVE und BAUSE (21) zumindest teilweise in Frage gestellt wurden. Die genannten Autoren fanden bei experimentell erzeugten Traumata gegen Schädel von Leichen in 4 von 30 Fällen makroskopisch erkennbare Kontusionsblutungen subkortikal und zentral, deren mikr. und makr. Unterscheidungsmöglichkeit von vitalen Verletzungen sie zwar bejahen, eine Täuschungsmöglichkeit sei aber immerhin gegeben.

Prinzipiell unterscheidet man allgemeine und lokale vitale Reaktionen. Uns interessieren hier nur lokale vitale Reaktionen, also Veränderungen, die durch örtlich begrenzte Gewebsschäden entstanden sind, wie z.B. Veränderungen an Blutaustritten ins Gewebe (zeitkorrelierende Verfärbungen) und an mechanisch be-

dingten Hautwunden, die u.a. von RAEKALLIO (27) besonders gründlich untersucht wurden.

Nekrose und Entzündung sind die Hauptkomponenten der lokalen vitalen Reaktion bei mechanisch bedingten Hautwunden. Das früheste mit der üblichen Histologie erfassbare Zeichen der Entzündung war dabei die Leukocytose, deren Beginn von mehreren Autoren sehr different mit frühestens 4 bis spätestens 16 Stunden posttraumatisch angegeben wurde.

RAEKALLIO versuchte dann, die Latenzperiode von 4 - 8 Stunden posttraumatisch zu differenzieren, mit dem Grundgedanken, daß den morphologisch faßbaren Veränderungen funktionelle Änderungen des Gewebs- und Zellstoffwechsels vorausgehen.

Bei gedeckten Schädel-Hirntraumen, spez. den sog. Rindenprellungsherden, besteht ein Unterschied insofern, als es sich um aseptische Hirnwunden handelt und die Wundheilung im Hirngewebe auf Grund des speziellen histologischen Aufbaus und der Eintönigkeit der Reaktion der 3 Grundgewebsarten (Gliöse, mesodermale und neuronale Elemente) auf Noxen jeder Art deutliche Unterschiede zur Wundheilung an der Haut zeigt.

Die Reparation und Organisation von Hirnwunden obliegt nach KREUTZBERG (17) praktisch nur der Glia und dem Mesenchym, es erfolgt keine Einwanderung von Entzündungszellen.

1.1.2. Die Routinehistologie erstreckt sich in der Rechtsmedizin im Wesentlichen auf die Färbung von formolfixierten, in Paraffin eingebetteten Dünnschnitten von 7 μ m Dicke in üblichen Verfahrensweisen.

Zur Darstellung der Nerven- und Gliazellen wird die Kresyl-echtviolett-Färbung angewandt, obwohl die Nissl-Färbung zwar noch exaktere Ergebnisse bringen würde, wegen der Fixierungsvorschriften (Alkohol) sich aber in der Praxis nicht verwirklichen läßt. Mit dieser Färbung lassen sich Veränderungen der Ganglienzellen in Form (Zelleib, Fortsätze, Kern) und Farbe (Kern,

Cytoplasma) gut erfassen. Auch eventuell auftretendes Formalin-pigment wird dabei erfaßt.

Zur Bindegewebsfärbung kann man die Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner verwenden, mit der auch ödematöse Veränderungen erfaßbar sind.

Zur Gliafaserfärbung kann man zusätzlich die Färbung nach Holzer verwenden. Damit lassen sich Veränderungen der Gliazellen erfassen:

Astrocyten (Proliferative Veränderungen, gemästete und faserbildende Glia)

Oligodendroglia (Buscaino'sche Veränderungen bei Hirn-
ödem: Wasseraufnahme, Anschwellung,
wasserklarer Hof)

Hortega'sche Mikroglia (Auftauchen von charakt. stäbchen-
förmiger Mikroglia, Fettkörnchen-
zellen)

Gefäße (Lumenveränderungen, Proliferation, Wucherungen)

Wichtig zur Beurteilung ist auch das Auftreten von Blutabbau-
stoffen wie Hämosiderin und Hämatoidin. Hämatoidin ist der
eisenfreie Teil des Hämoglobins, entsprechend dem Bilirubin,
wird jedoch in der Histologie als Hämatoidin gekennzeichnet.
Es stellt sich extrazellulär als charakteristisches, gelbes
Pigment in Kristallnadelform dar und gibt keine positive Eisen-
reaktion.

Hämosiderin als eisenhaltiger Molekülkomplex gibt eine positive
Berliner-Blau-Reaktion und liegt teils extrazellulär, teils
intrazellulär.

Als weitere Routinemethode z.B. zur Darstellung von Blutungen,
aber auch gemästeten Astrocyten, die sich stark eosin-rot dar-
stellen, wird die HE-Färbung verwendet.

Nicht so gut gelingt die Darstellung des Neuropils mit diesen Färbungen, d.h. aller zwischen den Perikarya der Ganglien- und Gliazellen liegenden Strukturen innerhalb der grauen Substanz unter Ausschluß der Gefäße. Wir hofften nun auf eine größere Aussagekraft von spez. enzymhistochemischen Methoden, da z.B. SDH, NADD, LDH eine recht gute Aktivität des Neuropils zeigen und somit eine Bereicherung der Beurteilungskriterien bringen sollten.

1.1.3. Über den Entstehungsmechanismus der Kontusionen gibt es zahlreiche Theorien verschiedener Autoren, wie sie z.B. bei PETERS (23) ausführlich diskutiert werden. Die Summe der morphologischen Veränderungen bei gedeckten Hirnverletzungen läßt sich durch eine einzige Theorie wohl bis heute noch nicht schlüssig darlegen, man neigt aber heute eher zu der Auffassung die SELLIER und UNTERHARNSCHIEDT (30) in experimentellen Untersuchungen vertreten haben, nämlich daß positiver und negativer Druck bei Beschleunigung des masseträgeren Gehirns die wesentliche physikalische Ursache für das Auftreten sog. coups und contrecoups sei. Die frühere Annahme einer Druck- und Stoßwelle durch das Gehirn wird von ihnen abgelehnt. Zusätzlich diskutiert man heute auch noch den Caisson-Effekt, wie er bei der Taucherkrankheit in ähnlicher Weise auftritt, nämlich Gefäßzerreißungen mit Rhexisblutungen durch die plötzliche Freisetzung von Sauerstoff und Stickstoff durch den entstehenden Unterdruck. Über die Bestimmung der Stoßrichtung, Prädilektionsstellen (z.B. in Abhängigkeit von der Dicke des Liquorpolsters) und die Zusammenhänge zwischen anatomischem Befund und klinischem Bild informiert E. WELTE (39).

Wichtig erscheint auch noch die Tatsache, daß selbst schwere traumatische intrakranielle Schädigungen ohne größere, äußerlich sichtbare Veränderungen auftreten können.

Für uns bedeutend ist die Unterscheidung zwischen primär mechanischer Schädigung und sekundär, d.h. zeitlich später auftretenden, sekundären Schädigungen durch Hirndruck, Hirnödem und Stoffwechselstörungen, da dies zu falscher Interpretation des Alters der Verletzung führen könnte.

Primär mechanische Schädigung:

Durch die Gewalteinwirkung kommt es zur Zerreißung von Kapillaren, Arterien und kleinen Venen mit Blutaustritt in das umgebende Gewebe, aber auch zur direkten Schädigung von Nervenzellen wie Axonabrissen und Membranschädigungen (Aufnahme von Formalin, frühes Auftreten von Formalinpigment).

Sekundäre Schädigung:

Die durch den Blutaustritt gestörte Gewebsdurchblutung führt zur hypoxämischen Schädigung von Nervenzellen und Endothelzellen, da diese besonders empfindlich auf Sauerstoffmangel reagieren. Die Umstellung auf anaerobe Glykolyse führt zur Anhäufung saurer Stoffwechselprodukte und zur lokalen Azidose, zur Aktivierung zelleigener, eiweißverdauender Enzyme und später dann durch den Einstrom von Gewebsflüssigkeit aus der Umgebung zum lokalen Ödem und damit zur weiteren Verminderung der Durchblutung. Nach HOFF und JELLINGER (zitiert bei PETERS (24)) liegt bei traumatischen Hirnschäden ein gemischtes Ödem vor, d.h. ein eiweißreicheres, schwerer resorbierbares als beim rein physikalisch bedingten Ödem. Dieses Ödem kann nur zu Anfang und nur zum Teil durch intrazelluläre Flüssigkeitsaufnahme der Astroglia kompensiert werden, wird dann jedoch perikapillär, perivaskulär und transzellulär weitergeleitet, bis es dann bei stärkerem Ödem zur Ablösung der perikapillären Astrocytenfortsätze von der Basalmembran und zum völligen Zusammenbruch der Blut-Hirnschranke kommt. Bei ausgedehnteren Kontusionsblutungen sind dann auch Störungen im Liquorkreislauf und Ausbildungen von Hirndruckzeichen möglich, auch im Zusammenhang mit einem posttraumatischen, globalen Hirnödem.

Entscheiden ist nun, daß die umfassende Reduzierung der Durchblutung zur hypoxämischen Schädigung der Endothelzellen und damit zur Ausbildung sekundärer Druckblutungen führen kann. Diese Druckblutungen treten somit sicher später auf und dürfen nicht mit primären Kontusionsherden verwechselt werden. Über die makr. Unterscheidungsmöglichkeit bei der Entnahme des Gehirns wird später berichtet.

1.2. Die Literatur über den Ablauf der Veränderungen nach Hirnverletzungen ist vielfältig und hier nur kurz abzuhandeln. Die wichtigsten Arbeiten stammen sicher von H. SPATZ (32) und seiner Schule. Besonders G. PETERS (23) hat in mehreren Veröffentlichungen einen zusammenhängenden Überblick über die Vorgänge gegeben. RAND und COURVILLE (28) sowie KRAULAND (14) haben sich speziell mit zeitbezogenen Gewebsveränderungen nach Hirnverletzungen befaßt.

SPATZ (32) und PETERS (25) unterteilten den Gesamtablauf der Veränderungen in 3 zeitlich abgrenzbare Stadien:

Stadium I umfaßt die Vorgänge von Blutung und
Nekrose (nach ca. 1 - 2 Tagen)

Stadium II umfaßt die Vorgänge der Resorption und
Reparation (nach ca. 4 - 30 Tagen)

Stadium III den narbigen Endzustand

Für uns wichtig wegen der Dynamik der Veränderungen sind dabei besonders das Stadium I und das frühe zweite Stadium.

1.2.1. Die frühesten Reaktionen auf ein Trauma sind nach der Vulnerabilitätsordnung an den Nervenzellen zu beobachten. Die vielfältigen Erscheinungsmuster der Nervenzellschädigung mit teilweise zeitlichen Überschneidungen sind dabei: Tigrolyse mit Kernmembranabblassung, Vakuolenbildung, Zellschrumpfung (Pyknose) und wabige Veränderungen, Inkrustationen, korkenzieherartige Veränderungen und Kompressionsformen. Diese Veränderungen wurden z.T. schon nach kürzester Zeit beschrieben, differierten zeitlich aber z.T. erheblich, so daß eine eindeutige Aussage der zeitlichen Abfolge nicht gemacht werden kann. Sicher scheint nur eine totale Abblassung nach 48 Stunden, wie sie PETERS (23) in der Regel beobachtete. Auch das Auftreten von Formalinpigment auf Grund der gestörten Membranpermeabilität wie es RAND und COURVILLE (28) nach wenigen Stunden bis 3 1/2 Tagen posttraumatisch beschrieben, wurde bisher von keinem anderen Autor bestätigt. GREENFIELD (10) spricht nur allgemein von einem frühen Auftauchen des Formalinpigments nach Kontusionen.

Auch über das erste Auftreten von Blutabbaupigmenten differieren die Zeitangaben. Hier alle Autoren aufzuzählen wäre zu umfangreich, man kann aber wohl ungefähr von neueren Veröffentlichungen wie ZOLLINGER (42) ausgehen, wonach Hämosiderin frühestens 6 Tage nach dem Trauma und Hämatoidin nach ca. 13 Tagen auftreten.

In jüngster Zeit teilten jedoch WILLE und Mitarbeiter (40) zusammenfassend mit, daß Hämosiderin bis 4 Stunden postmortal entstehen kann, am Lebenden 4 Stunden posttraumatisch auftritt und 4 Tage nach einer Verletzung stets in granulärer Form vorhanden sei.

Zusammenfassend und vereinfachend läßt sich sagen: Nach einigen Stunden postmortal kommt es zur Nekrose der nervösen Substanz mit Untergang von Nervenzellen, Nervenfasern, Glia und meist auch der Gefäße.

1.2.2. Das zweite Stadium beginnt nach Beschreibung zahlreicher Autoren nach ca. 4 - 5 Tagen und äußert sich in einer Proliferation des Gefäßbindegewebes mit Randwallbildung durch Gefäßsprossung. Sich ablösende Gefäßwandzellen bilden sich zu Fettkörnchenzellen um und schließlich ist der ganze Nekroseherd von Gefäßen durchzogen, deren Maschen mit Körnchenzellen durchsetzt sind. KIENE und KÜLZ (12) verzeichneten ein Auftauchen dieser Fettkörnchenzellen nach 15 Tagen. Das Maximum der Gefäßwucherung wird von UNTERHARNSCHIEDT (37), FISCHER und SPANN (6), PETERS (25) und anderen einheitlich in die 4. Woche verlegt. Das Verschwinden der Makrophagen wird von vielen Autoren auf etwa nach 4 - 5 Wochen gelegt.

Es gibt also bis jetzt kaum Arbeiten über eine genaue zeitliche Differenzierung des Wundalters und der Vitalität von Hirnrindenverletzungen, vor allem nicht mit einer an Sicherheit grenzenden Wahrscheinlichkeit, wie sie im Strafprozess z.B. notwendig ist. Im Rahmen einer größeren Arbeit sollten nun enzymhistochemische Untersuchungen ähnlich wie bei RAEKALLIO (27) an Hautwunden durchgeführt werden, da sich durch Enzymveränderungen vielleicht

eine genauere zeitliche Abstufung erreichen ließe und sich vor allem zusammen mit den systematisierten Untersuchungen der Routinehistologie ein Schema der Beurteilung und Abgrenzung aufstellen ließe.

1.2.3. Die Idee, enzymhistochemische Methoden in der forensischen Medizin zur Abklärung der vitalen Reaktion und zur Wundaltersbestimmung einzusetzen, stammt von RAEKALLIO (27). Er ging davon aus, daß einer mikroskopisch erkennbaren Veränderung, wie sie durch zahlreiche Autoren wie z.B. WALCHER (38), Zollinger, Prokop, Allgöwer u.a. beschrieben wurde, eine reaktive Stoffwechselveränderung vorausgehe. Diese könne man durch enzymhistochemische Reaktionen erkennbar machen. Er untersuchte das Verhalten der aPh., der Adenosin-Triphosphatase, der sPh., der Aminoptidasen, der uE., der Beta-Glucuronidase, der Transferasen und der Oxidoreductasen. Durch seine Versuche konnte er nachweisen, daß bei Hautwunden schon in weniger als 1 Stunde nach dem Trauma bestimmte Enzyme charakteristischen Reaktionen unterworfen sind. Da die früheste histologische Veränderung, das Auftreten von Leukocyten im traumatisierten Gewebe, erst nach 4 Stunden auftrat, konnte er mit dem Schädigungsmuster der Enzymhistochemie diesen Zeitraum erfassen und beurteilen. Eine ähnliche Untersuchung für das Enzymverhalten nach thermischen Hautschäden legte schon 1963 PIOCH (26) vor, sodaß ähnliche Untersuchungen für andere Organe und Gewebe sinnvoll erscheinen, obwohl die Haut andere Verhaltensmuster der Enzyme aufweise (RAEKALLIO (27)). COLMANT (5) hatte dann, mit anderer Fragestellung, die Enzymhistochemie des Rattengehirns nach hypoxämischen Schädigungen dargestellt. KREUTZBERG und PETERS (15) untersuchten die Histochemie beim experimentellen Hirntrauma der Ratte. Diese Befunde werden später dargestellt, es soll nur festgestellt werden, daß histochemische Veränderungen am Gehirn nach Traumen unterschiedlicher Art an Versuchstieren festgestellt worden waren. Deshalb versprach eine Untersuchung menschlichen Obduktionsmaterials mit forensischen Fragestellungen eine Erweiterung und Bereicherung der rein histologischen Möglichkeiten.

Die Einteilung der Enzyme in verschiedene Klassen und Spezielles zur Enzymologie kann aus jedem guten biochemischen Lehrbuch entnommen werden.

Gefärbt wurden insgesamt 3 Oxydoreductasen (SDH, NAD-DIA, LDH) und 3 Hydrolasen (UE, sPh, aPh), zusätzlich zu Vergleichszwecken und zur Kontrolle 2 Routinefärbungen der Histologie, eine Färbung nach Goldner und eine mod. nach Nissl.

Diese Auswahl wurde nach Literaturstudium unter dem Gesichtspunkt von Frühveränderungen und Spätveränderungen dieser Enzyme bei pathologisch verändertem Hirngewebe getroffen.

Die beiden hier untersuchten Enzyme sind SDH und NAD-DIA.

B. MATERIAL UND METHODE

2.1. Enzyme als Biokatalysatoren finden sich in allen pflanzlichen und tierischen Organismen. Man kann sie biochemisch qualitativ wie quantitativ, z.B. in Gewebsextrakten oder Blutserum nachweisen. Auf eine Lokalisation der Enzyme muß bei diesem Untersuchungsverfahren jedoch verzichtet werden. Die Lokalisierung bestimmter Substanzen oder Aktivitäten in Zellen oder Zellorganellen ermöglicht die Histochemie. Mit der Einführung der Histochemie (1936 Veröffentlichung von Lisons "Histochemie animale" (19)) und der Entdeckung der ersten histochemischen Nachweismethode, der alkalischen Phosphatase, gleichzeitig 1939 durch TAKAMATSU und GOMORI (9) begann eine schwunghafte Entwicklung, die sich in der ständig wachsenden Zahl von Publikationen und in der Gründung mehrerer histochemischer Zeitschriften und der Herausgabe von Standardwerken widerspiegelt.

Nach der Entwicklung neuer, vereinfachter und verfeinerter Nachweismethoden und vor allem der Weiterentwicklung der technischen Möglichkeiten der Verarbeitung (Kryostat, Gefriertrocknung usw.) kann man heute sagen, daß die Enzymhistochemie an vielen Instituten bei der Anwendung erprobter Verfahren zu einer Routinemethode geworden ist, die jedoch große Erfahrung und Einarbeitung erfordert.

2.1.1. In der Enzymhistochemie kommt es darauf an, das Enzym und das bei der Substratumsetzung anfallende Reaktionsprodukt am Ort des Vorkommens zu erhalten, die Zell- und Gewebsstruktur zu bewahren und das Endprodukt der Reaktion mikroskopisch sichtbar zu machen.

Folgende Forderungen sind deshalb bei jeder enzymhistochemischen Untersuchung zu beachten: (LOJDA u.a. (20))

1. Gewebe- und Schnittvorbehandlung sollen die Verteilung und Aktivität des Enzyms möglichst unbeeinflusst lassen
2. Substrat und Hilfsreagentien sollen gleich schnell in alle Zellen und ihre Bestandteile eindringen

3. Es soll möglichst große Substratspezifität des Enzyms vorliegen
4. Hilfsreagentien sollen die Enzymreaktion und das Eindringen des Substrates nicht behindern
5. Das Produkt der Enzymreaktion soll sich schnell mit dem Hilfsreagens verbinden, möglichst unabhängig vom Zellmilieu
6. Sofortige Ausfällung des Endprodukts, Unlöslichkeit in Wasser und in Lipiden, es soll auch amorph oder zumindest mikrokristallin sein
7. Die an der Reaktion beteiligten Substanzen sollen nicht außerhalb der enzymaktiven Orte in der Zelle gebunden oder absorbiert werden.

Die Erfüllung all dieser Forderungen ist oft nicht möglich, deshalb müssen Kompromisse eingegangen werden. Speziell in unserem Fall, da eine Methode zur Anwendung kommen sollte, die im Rahmen der rechtsmedizinischen Routineuntersuchungen ohne allzu großen apparativen Aufwand und möglichst universell anwendbar sein sollte.

2.1.2. Grundsätzlich kann man 4 Reaktionsprinzipien unterscheiden (nach LOJDA (20)):

1. Fällungsreaktionen
 - a. Präzipitationsreaktionen mit Metallkationen (Gomori-Typ)
 - b. simultane Azokupplung
 - c. Indigogenmethode
 - d. Tetrazoliummethode
 2. Sukzedane Azokupplung
 3. Synthesereaktionen
 4. Substratfilmverfahren (Proteinasen, Nucleasen, Amylasen)
- 1 a: Nach dem Gomori-Typ erfolgt der Nachweis von Phosphatasen, Sulfatasen und Cholinesterasen. Es wird heute mehr und mehr von Azokupplungsmethoden verdrängt, da für eine ortstgetreue Präzipitation eine ausreichende Konzentration von Metallkationen erforderlich ist, die jedoch ihrerseits die Enzymaktivität hemmen und einige Gewebe Metallophilie besitzten.

Man verwendet zunehmend die

- 1 b: simultane Azokupplung, mit der Phosphatasen, Glykosidasen, Esterasen und Peptidasen dargestellt werden. Als Substrat werden unsubstituierte und substituierte Naphtol- sowie Naphtylaminderivate verwendet, als Kuppelsalze Diazoniumsalze mit unterschiedlichem chemischen Aufbau und Charakter. (Fast Blue B, Fast Blue BB, Fast Blue RR, Hexazonium-p-rosanilin).

Wichtige Kriterien bei der Arbeit mit Diazoniumsalzen

Es ist auf Stabilität der Diazoniumsalze im Inkubationsmedium, Kupplungsgeschwindigkeit (je höher desto besser), Hemmrate und Partikelgröße des gebildeten Azofarbstoffs zu achten.

Nach diesem Prinzip wurden UE, sPh, aPh, gefärbt.

- 1 c: Die Indigogenmethode mit Indoxyl- oder Indolylaminderivaten als Substrat wurde nicht angewendet.
- 1 d: Tetrazoliummethode zum Nachweis von Dehydrogenasen und Monoaminoxidase. Nach diesem Prinzip wurden SDH, NADD und LDH gefärbt.

Es gibt zu den jeweiligen Nachweismethoden viele Arbeitsvorschriften einzelner Autoren, die zum Teil von einander differieren und spezielle Vor- und Nachteile haben.

Da der gesamte Färbevorgang kompliziert und zeitraubend ist und viel Sachkenntnis erfordert, wurde eine Mitarbeiterin damit beauftragt und speziell dafür am Institut für Tierpathologie (Prof. Dr. Dahme) ausgebildet. Nach Rücksprache wurden auch die von diesen Kollegen bereits erprobten Nachweisverfahren übernommen.

2.2.1. Nachweis der SDH und Stellung im Stoffwechsel.

Die SDH stammt aus dem Citrat-Zyklus, ist coenzymunabhängig (d.h. sie ist nicht an NAD gebunden und benötigt kein gewebe-eigenes NAD zum Nachweis) und katalysiert folgende Reaktion äußerst substratspezifisch:

SDH + Akzeptor $\longrightarrow$ Fumarat + reduz. Akzeptor

Sie ist das erste Enzym aus der sog. Succinoxidase-Kette, die mit der Cytochromoxidase endet. Es handelt sich um ein Flavo-

proteinenzym, das SH-Gruppen enthält und daher durch SH-Gruppenblocker (Hg, Selen, p-Chlormercuribenzoat) nichtkompetitiv inhibiert werden kann. Kompetitive Hemmer sind Malonsäure und Oxallessigsäure, eine Hemmung erfolgt auch durch das entstehende Produkt, die Fumarsäure.

Das pH-Optimum liegt zwischen 7,6 und 8,5.

Die SDH ist strukturgebunden (Mitochondrien), daher wenig diffusionsempfindlich, aber außerordentlich fixationsempfindlich, bei Autolyseprozessen jedoch erstaunlich stabil. Es gibt Auskunft über die Aktivität des Krebszyklus und, da dieser in Verbindung mit der Atmungskette abläuft, auch über den aeroben Stoffwechsel. (Ischämische Veränderungen z.B.)

Physiologischer Akzeptor des Wasserstoffs ist das Ubichinon oder Cytochrom b, unphysiologischer Akzeptor zur histochemischen Darstellung z.B. das früher verwendete Methylenblau oder heute die Tetrazoliumsalze, die zu farbigen, lipid- und wasserunlöslichen, amorphen Formazanen reduziert werden und sehr stabil sind. (LOJDA u.a. (20))

Unter den zahlreichen Verfahren, die heute zur Darstellung der SDH wie auch der NADD zur Anwendung kommen, haben wir die von Priv. Doz. Dr. D. STAVROU, Institut für Tierpathologie der Universität München, bereits erprobten Färbemethoden übernommen.

Fixation: Kryostatschnitte

Inkubationslösung: 10,0 ml 0,2 m Phosphatpuffer pH 7,6
 10,0 ml 0,2 m Natriumsuccinat
 (falls die SDH stark ausfällt mit 20,0 ml
 A. bidest verdünnen)
 15,0 mg TNBT lösen in 2,0 ml Dimethyl-
 formamid (Lösungsvermittler)

vor Gebrauch beides zusammenkippen und
 evtl. filtrieren

Inkubationszeit: 30 Min. bei 37° C

waschen in 0,9 % NaCl-Lösung

fixieren in 10 % Formol 10 Min.

spülen in 15 % Alkohol	5 Min.
Hämalaun	10 Min.
fließend wässern	10 Min.
eindecken in Glycerin-Gelatine	

Substrate und Lösungen: 0,2 m Na-Succinat: 5,7 g/100 ml A.bidest
TNBT der Fa. Serva, Nr. 35935

Resultat: Blauschwarze Farbstoffablagerungen.

TNBT ist, obwohl teurer, dem NBT bei lipidreichen Geweben vorzuziehen, da letzteres an Grenzflächen zwischen Lipid- und Wasserphase relativ grobe Granula bildet.

Das Dimethylformamid dient als Lösungsvermittler, da TNBT zwar wasserlöslich ist, aber nicht ausreichend schnell gelöst wird. Eine Cyanidhemmung der Cytochromoxidase wie bei NT und BT erübrigt sich, da TNBT eine wesentlich bessere Affinität zu den freigesetzten H^+ hat als NT und BT und diese H^+ Ionen dadurch nicht auf die Atmungskette gelenkt werden können.

Der optimale Arbeits-pH liegt zwischen 7,2 und 7,6, bei höherem pH würde es zum nothing-dehydrogenase Effekt kommen, d.h. einer nicht enzymatischen Reduktion des TNBT. Die Pufferkapazität der Inkubationslösung ist dabei sicher ausreichend, um die bei Blutungen auftretende Azidose abzufangen und den pH im Arbeitsbereich zu stabilisieren.

Die Haltbarkeit der einzelnen Substanzen ist bei Befolgen der jeweiligen Vorschriften gewährleistet, die Färbung war gut und verlief ohne Probleme.

2.2.2. NAD-abhängige Diaphorase

Die Reoxydation von NADH erfolgt vorwiegend in der Atmungskette durch die NADH-Dehydrogenase, cytochrom-Reductase und das cytochrom b_5 , das NADH kann aber auch von Flavinenzymen katalysiert werden, die dann als Diaphorasen bezeichnet werden. (NAD-abhän-

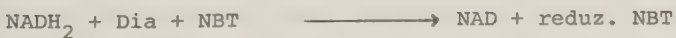
gige Diaphorase (NADD) oder Diaphorase I, und NADP-Diaphorase (NADPD) oder Diaphorase II, alte Bezeichnungen sind DPN und TPN Diaphorase. Neue Bezeichnungen nach LOJDA (20) sind Tetrazolium-reductasen)

Diaphorasen nehmen Wasserstoff reversibel auf und geben ihn an verschiedene, u.a. auch künstliche Akzeptoren ab, wie z.B. Methylenblau, Ferricyanid und Tetrazoliumsalze. Eigentlich sind sie also Vermittler zwischen Wasserstoff-Donatoren und Akzeptoren. Bei pH 7,2 bis 7,4 werden die reduzierten Coenzyme außerordentlich effektiv oxidiert, die Tetrazoliumsalze jedoch nicht oder vernachlässigbar direkt reduziert. Erst bei pH 8 erfolgt eine langsame Reduktion von Tetrazoliumsalzen direkt durch NADH oder NADPH. Die NADD ist relativ fest strukturgebunden in den Mitochondrien und im EPR (die NADPD z.B. nur im EPR).

Beide geben Auskunft über die intrazelluläre Oxidationskapazität, durch die die reduzierten Coenzyme regeneriert werden können, also praktisch über den Energiehaushalt, im Gegensatz zur SDH jedoch nicht direkt vom aeroben Stoffwechsel abhängig.

Sie reduzieren natürlich auch Coenzyme, die von anderen NAD-abhängigen Dehydrogenasen geliefert werden, d.h. Diaphorasen bestimmen auch die Lokalisation der zu untersuchenden Dehydrogenasen. Bei der Darstellung der Dehydrogenasen mit den klassischen Methoden wird immer die zugehörige Tetrazoliumreductase und nicht die betreffende Dehydrogenase lokalisiert, so daß z.B. beim Nachweis der LDH die NADD mit erfaßt wird.

Vereinfachtes Schema:



Biochemisch wird von rechts nach links gemessen, histochemisch von links nach rechts, da reduziertes NADH zur Indikatorreaktion mit Tetrazoliumsalzen benötigt wird.

Diaphorasen können dabei die Dehydrogenasereaktion limitieren, da sie zwischen red. Coenzym und Akzeptor vermitteln (siehe Schema). Dadurch entstehen Artefakte, d.h. LDH-Aktivität erscheint an Stellen, wo die Diaphorase beteiligt ist artefiziell niedriger, was wir auch beobachten konnten und was mit Ergebnissen anderer Autoren übereinstimmt.

Qualitativ sind also NADD und NAD-abhängige Dehydrogenasen wie LDH, MDH u.a. kaum zu unterscheiden, quantitativ zeigt die Diaphorase jedoch eine deutlich stärkere Aktivität.

Bei der Färbung wurden manchmal geringe Diffusionserscheinungen beobachtet, die von der postmortalen Liegedauer deutlich abhängen, durch Erhöhung der Fixationszeit auf 10 Minuten jedoch zu beherrschen waren.

Färbemethode:

Inkubationslösung: 4.0 mg NADH_2 - R (Böhringer Mannheim)
 0.8 ml 0.1 mol Phosphatpuffer pH 7.4
 1.0 mg Nitro BT
 2.2 ml A. bidest

Schnitte 10 Min. in Formol-Calcium vorfixieren, waschen in A. bidest

Schnitte in Paraffin umranden

Inkubationslösung auf die Schnitte tropfen und 60 Min. bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren,
 eindecken in Gelatinol.

Lösung: Phosphatpuffer ($\text{Na H}_2\text{PO}_4$ prim. sauer)
 MG 137.99 0.1 m 13.8 g ad 1000 ml A. bidest
 0.2 m 27.6 g ad 1000 ml A. bidest

Phosphatpuffer (Na_2HPO_4 sek. alkalisch)
 MG 177.99 0.1 m 17.8 g ad 1000 ml A. bidest
 0.2 m 35,6 g ad 1000 ml A. bidest

den alkalischen Puffer mit dem sauren Puffer auf pH 7.4 einstellen.

Resultat: Ausfällung von schwarzem Kobalt-Formazan.

2.2.3. Kontrollreaktionen

Oft werden in der Enzymhistochemie Kontrollreaktionen wie z.B. Inkubation aktiver Schnitte mit Medium ohne Substrat oder Inkubation von hitzeinaktivierten Schnitten mit komplettem Medium durchgeführt. Wir verzichteten darauf, da es sich um erprobte Verfahren handelte, histochemische Normalbefunde ausreichend bekannt waren und parallel dazu Färbungen (histochem. und histologisch) von unverletzten Arealen durchgeführt wurden.

Zum Vergleich zwischen histologischem und histochemischem Befund wurden in allen Fällen von den Gefrierschnitten Parallelschnitte mit Routinemethoden gefärbt:

Kresylechtviolett zur Darstellung von Nerven- und Gliazellen,
die modifizierte Masson'sche Trichromfärbung (nach Goldner) zur Darstellung von Kernen, Cytoplasma, Erythrocyten und Bindegewebe.

Kernfarbstoffe mußten wir dabei bedeutend länger einwirken lassen als bei formolfixierten Schnitten und eine Vorfixierung mit Formalin vornehmen, da sich sonst bei der Kresylfärbung sogenannte Wasserveränderungen mit Aufblähung und Auflockerung der Kerne und des Cytoplasmas ergab und die Färbung insgesamt zu schwach war. Aber selbst bei Vorfixierung ist die Färbung von Gefrierschnitten bezüglich feincytologischer Aussagen mit normalen, formalinfixierten Paraffinschnitten nicht vergleichbar, was COLMANT's Auffassung (5) nur bestätigt.

Die Färbung nach Goldner diente vor allem der eindeutigen mikr. Lokalisierung und Ausdehnung von Blutungen (grünliche Aussparungen, da nach Peters (23) freie Gewebsflüssigkeit seegrün gefärbt wird), um damit einen exakten Größenvergleich zwischen Blutung und Abblassung im Neuropil bei enzymhistochemischen Präparaten zu ermöglichen.

2.3. Es handelt sich um Hirngewebe mit Rindenprellungsherden von insgesamt 76 Fällen gedeckter Schädel-Hirnverletzungen aus dem Obduktionsgut des gerichtsmedizinischen Instituts der Universität München der Jahre 1975 und 1976. Die Todesursache spielte bei der Auswahl keine Rolle, es handelt sich in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle um Verkehrsunfälle, weniger um Schussverletzungen. Es wurde grundsätzlich nach dem makroskopischen Bild der Rindenprellungsherde vorgegangen.

2.3.1. Nach SPATZ (aus PETERS, 24) kann man die primär traumatisch bedingten Rindenblutungen von kreislaufbedingten Schäden (sekundäre Druckblutungen) durch folgende Merkmale abgrenzen:

1. Kuppenständigkeit der Herde (kreislaufbedingte Blutungen finden sich vorwiegend in Rindentälern)
2. Die praktisch immer vorhandene subarachnoidale und subdurale Blutung lokal über den Herden (bei vaskulären Blutungen fehlen Blutaustritte in die weichen Häute)

Diese Abgrenzung ist deshalb von Bedeutung, da kreislaufbedingte Blutungen z.B. durch Druck zeitlich sicher später auftreten und u.U. zur Fehldiagnose führen können. Beurteilt wurden nur die Blutungsareale und deren unmittelbare Umgebung. Es treten zwar auch in grösserer Entfernung Schädigungen auf, diese "hinken" den ursprünglichen Schäden jedoch zeitlich nach sind meist auch kreislaufbedingt.

Die Gehirne wurden entsprechend dem routinemäßigen Verlauf der gerichtlichen Sektion in toto entnommen und anschließend wurden Stücke mit ein bis zwei Windungen mit deutlichen, kuppenständigen Blutaustritten möglichst mit angrenzendem Windungstal entnommen. Aus der unverletzten Hemisphäre wurden zu Vergleichszwecken an genau entsprechender Stelle ebenfalls Gewebsteile entnommen. Die Gewebsblöcke wurden sofort in einer Schnellgefrierkammer an einer Kohlendioxydbombe tiefgefroren, luftdicht in Plastik verschweißt und nach Markierung (Sektionsnummer und Überlebenszeit) in einer Tiefkühltruhe bei einer Temperatur von -20 bis -25 Grad Celsius aufbewahrt.

Folgende Begleitdaten wurden notiert:

1. Die Nummer der gerichtlichen Sektion zur Identifikation
2. Unfallzeitpunkt, Todeszeitpunkt und Überlebenszeit nach Polizeiberichten und Leichenschauschein
3. Zeitpunkt der Einlieferung, Einbringen der Leiche in die Kühlkammer, Zeitpunkt der Obduktion, nachträglich dann der Zeitpunkt des Schneidens und Färbens (wegen der postmortalen Liegedauer und Aktivitätsabnahme)
4. Alter, Geschlecht, Unfallart, Todesursache, etwaige Schädelbrüche und vor allem Hirndruckzeichen.

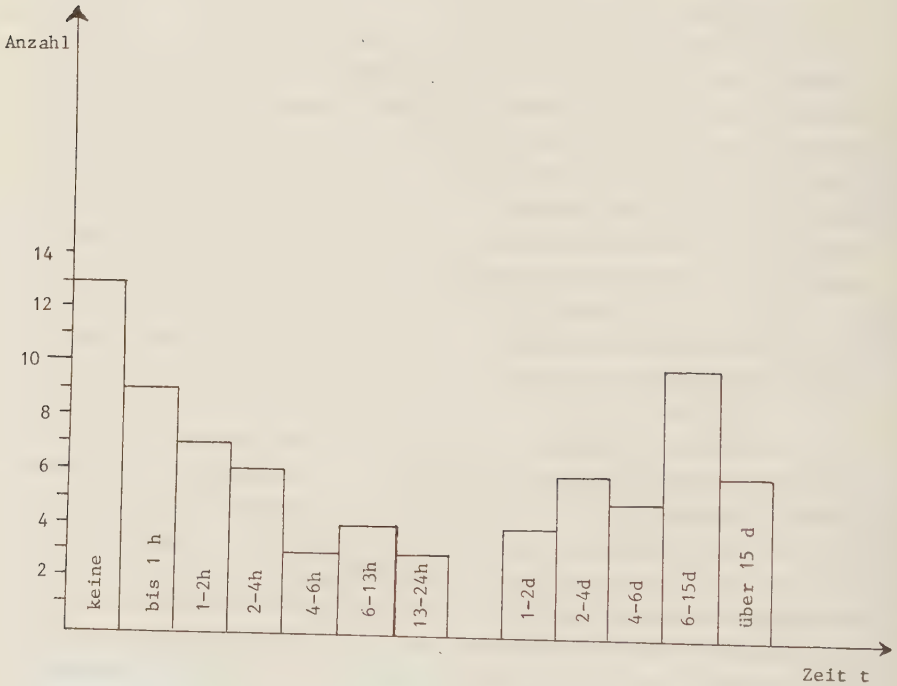
Die Altersverteilung erfaßte beide Geschlechter und alle Altersgruppen in ausreichend zufälliger Verteilung. Die Überlebenszeiten verteilten sich gleichmässig über einen Zeitraum von 15 Tagen, 6 Fälle hatten länger als 15 Tage überlebt. Fälle mit längerer Überlebenszeit wurden nicht aufgenommen, da die Reparation von Rindenprellungsherden in Form einer gliösen Narbe dann sicher abgeschlossen ist und eine Aussagekraft bezüglich einer zeitlichen Staffelung durch die Eintönigkeit der Veränderungen nicht mehr gegeben ist.

Nicht untersucht wurden auch offene Hirnverletzungen, da eine bakterielle Kontamination die Reaktion des Gehirns wie auch die enzymatischen Nachweise (durch Abgabe von Enzymaktivität durch Bakterien beispielsweise) möglicherweise verfälscht werden. Ebenso wurden schwerwiegende Erkrankungen des ZNS wie z.B. degenerative oder konsumierende Erkrankungen ausgenommen. Auch zentrale Blutungen wurden nicht verwertet, da das Schädigungsmuster wie auch die zeitlichen Abläufe der Reparation gegenüber Hirnrindenverletzungen abweichend verlaufen.

2.3.2. Es wurde eine Einteilung in 12 Gruppen vorgenommen, geordnet nach den Latenzzeiten zwischen Trauma und Todeseintritt, wie sie in Tabelle 1 wiedergegeben ist.

2.3.3. Wegen der sofort nach dem Tode beginnenden Autolyseprozesse, die die Lokalisation und Aktivität von Enzymen meist verändern, sollte das Gewebe möglichst sofort verarbeitet werden. Da die postmortale Liegedauer von Leichen in der Rechtsmedizin

Tab. 1: Häufigkeitsverteilung der untersuchten Fälle
nach Überlebenszeit



oft relativ lang und unterschiedlich ist, soll auf dieses Problem näher eingegangen werden.

2.3.4. Nach CHASON (3) ist es fragwürdig, den prämortalen Status von Organellen postmortal zu beurteilen, besonders wenn eine Schädigung vorausging, da durch die Zerstörung von Lysosomen und die Freisetzung von Enzymen andere zelluläre Strukturen verfälscht werden könnten. Als früheste lichtmikroskopische Veränderung an postmortalem Gewebe stellt er einen Wechsel der granulären in eine mehr diffuse Verteilung der Enzymaktivität heraus. Ebenso stellten LAZARUS u.a. (18) nach 4 Stunden postmortaler Liegedauer beim Kleinhirn der Ratte keine relevante Änderung der Aktivität der sPh bei Raumtemperatur fest, wohl aber wie Chason einen geringen Übergang der granulären in eine mehr diffuse zytoplasmatische Färbbarkeit. Nach 24 Stunden stellte er eine nur geringe allgemeine Aktivitätsminderung, jedoch zelluläre Veränderungen dergestalt fest, daß apikale Dendriten nicht mehr anfärbbar waren und granuläre Verluste mit Übergang in eine mehr diffuse Färbung auftraten.

COLMANT (5) zitiert mehrere Autoren, die während 6 Stunden postmortaler Liegedauer bei 7 oxydierenden Enzymen keinen wesentlichen Aktivitätsabfall feststellen konnten.

BARKA und ANDERSON (2) registrierten bei sPh und Dia keine wesentlichen Unterschiede in Autolyseversuchen gegenüber intravitalen Hirnschäden. Eder (zitiert bei Colmant) wies auf das unterschiedliche Verhalten der untersuchten Enzyme hin (Dia reagiert relativ unempfindlich, SDH, Esterasen und Phosphatasen jedoch relativ empfindlich).

Eine gründliche Untersuchung über die postmortale Stabilität oxidativer Enzyme von Rattenhirnen auf quantitativer Basis wurde von TYRER (36) mit folgenden Ergebnissen durchgeführt: SDH erscheint stabil sogar innerhalb 24 Stunden postmortaler Liegedauer bei 37 Grad Celsius, während Dia und LDH deutlich abfielen, bei 22 Grad Celsius jedoch nur geringe Aktivitätsverluste aufwiesen. Bei sofortiger Aufbewahrung in Leichenkühlräumen ergaben sich keinerlei cytologische Veränderungen oder Aktivitätsverluste der LDH innerhalb 25 Stunden wie auch nach 4 Stunden

Raumtemperatur. Eine Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf alle Hirnareale und auf menschliche Gehirne sei gegeben.

Unsere eigenen Beobachtungen ergaben folgendes:

Die meisten postmortalen Liegezeiten betrugen 1 bis 2 Tage und führten nur zu geringen Diffusionserscheinungen, nicht aber zu deutlichen Aktivitätsverlusten oder mikroskopischen Veränderungen. Nach 3 Tagen, deutlicher nach 4 Tagen postmortaler Liegedauer haben Nervenzellen bei SDH, NADD und LDH gelbliche Eigenfarbe, speziell bei NADD und LDH ergaben sich deutliche Diffusionserscheinungen, die die Zellgrenzen verwaschen erscheinen ließen und die Feinheit der Darstellung herabsetzten. Da eine Freisetzung von granulärer Aktivität auch bei traumatisch geschädigten Nervenzellen auftritt, ist eine Differenzierung in diesen Fällen erschwert.

Bei schon erweichten Gehirnen (lange Liegedauer oder starke Durchblutungsstörungen) ergab sich ein fast totaler Verlust der Anfärbbarkeit.

Bei normalen Umgebungstemperaturen erfolgt eine Abkühlung der Leiche um circa 1 Grad Celsius pro Stunde, das heißt nach circa 14 Stunden hat sie eine Temperatur von circa 22 Grad erreicht, was die postmortale Stabilität der Enzyme begünstigt. Deshalb waren unsere Ergebnisse auch sehr gut, wenn die Leiche sofort in die Kühlkammer gebracht wurde, auch wenn sie erst 2 bis 3 Tage danach obduziert werden konnte.

Zusammenfassung:

Unserer Meinung nach ist für die lichtmikroskopische Begutachtung für die 6 verwendeten Enzyme eine ausreichende Stabilität nach den oben erwähnten Bedingungen bis zu 48 Stunden postmortal gegeben. (Ausnahmen wären z.B. Lagerung über 24 Stunden in höheren Temperaturen) Die Feinheit der Darstellung nimmt ab diesem Zeitpunkt deutlich ab und es können vermehrt Artefakte auftreten.

2.3.5. Durch das Einfrieren sollen Stoffwechselvorgänge und Autolyseprozesse des unfixierten Gewebes sofort unterbunden werden und das Gewebe für den Schneidevorgang gehärtet werden. Es muß äußerst schnell erfolgen, um die bei der Weiterverarbeitung störenden und Artefakte bildenden Eiskristalle nicht entstehen zu lassen. Die Bildung von Eiskristallen hängt wesentlich von der Geschwindigkeit des Durchfrierens ab, und damit auch von der Größe der Gewebsblöcke, deren Kantenlänge 1 cm nicht überschreiten sollte, es sei denn, es wird auf subzelluläre Lokalisation der Enzyme weniger Wert gelegt. Da wir die Windungskuppen und das benachbarte Windungstal beurteilen wollten, waren unsere Gewebsblöcke meist etwas größer, die Ergebnisse trotzdem gut.

Zwischenzeitiges Auftauen führte zu massiver Kristallbildung und Zerreißung beim Schneiden, die eine Weiterverarbeitung und Beurteilung unmöglich machten.

Die verschiedenen Arten des Einfrierens (CO_2 -Schnee, Aceton, flüssiger Stickstoff, Hexan oder Heptan usw.) haben Vor- und Nachteile was Enzymaktivität, Lokalisation und Weiterverarbeitung betrifft. Das Verfahren der Gefriertrocknung würde eine sehr gute Strukturhaltung (notwendig für eine subzelluläre Lokalisation) liefern, setzt aber eine aufwendigere Technik voraus und außerdem fallen Dehydrogenasennachweise erheblich schwächer aus als bei normalen Kryostatschnitten. (WINCKLER 41)

2.3.6. Die Schnittherstellung erfolgte mit der heute üblichen Kryostatmethode. Verwendet wurde ein Cryo-Cut der AOI. Die Gewebsblöcke wurden mit Hilfe eines temperaturabhängigen Klebstoffs befestigt, so daß sich ein erneutes Anfrieren erübrigte. Die optimale Schneidetemperatur ist äußerst wichtig zur Herstellung guter Schnitte und differiert je nach Gewebe beträchtlich. Nach der Arbeitsanweisung des Kryostaten beträgt sie für Hirngewebe zwischen 0 und -15 Grad Celsius. Bei anderen Autoren variierte die Temperatur zwischen -8 und -25 Grad Celsius. Bei uns lag die optimale Schneidetemperatur bei circa -10 Grad, was eine genügend lange Adaptation des aus -20 Grad entnommenen Gewebes erfordert. Tieferen Temperaturen führten zu deutlichen Zerreißungen und kaum verwertbaren Ergebnissen. Die Schnittdicke ist

ebenfalls wichtig, da bei dünneren Schnitten die Diffusionswege der zum Nachweis benötigten Substanzen kürzer werden. Sie variierte bei verschiedenen Autoren zwischen 5 und 16 μm , teilweise sogar bis zu 30 μm . Wir wählten zuerst 14 μm , gingen dann auf 10 μm zurück, was mehr Sorgfalt und Erfahrung beim Schneiden erfordert, aber auch eine etwas feinere Darstellung brachte.

Der gesamte Schneidevorgang erfordert viel Erfahrung und der Erfolg hängt von vielen Parametern ab, die individuell erprobt und aufeinander abgestimmt werden müssen. Das betrifft z.B. die Inklinatation (Messerneigungswinkel), da es bei zu starker Neigung zur Bildung von Querwellen mit nachfolgenden Färbeartefakten kommt, unter Umständen sogar zur Splitterung des Gewebes, bei zu flacher Neigung kann sich das Gewebe zusammenschieben. Die Geschwindigkeit des Schneidevorgangs, die optimale Einstellung der Antirollplatte und ein sauberes, scharfes und fest-sitzendes Messer sind dabei hervorzuheben. Unter Berücksichtigung dieser Bedingungen sind ohne weiteres Serienschnitte in guter Qualität möglich.

Das Aufziehen der Schnitte erfolgt durch Heranführen eines zimmerwarmen Objektträgers. Die Schnitte tauen auf und haften, sollten aber ausreichend lang trocknen, da sie sonst bei der weiteren Behandlung abschwimmen können. Man kann auch in problematischen Fällen albuminisierte Objektträger verwenden oder mit einem Föhn progressiv trocknen.

Das Einbetten der Schnitte erfolgte in Gelatinol, das flüssig und wasserunverträglich ist. Andere Einbettmittel wie "Eukitt" oder ähnliches sind meist nicht anwendbar, da sie wasserfreie Präparate voraussetzen oder selbst alkoholhaltig sind und meist zu Veränderungen durch Lösung und Diffusion der Farbstoffe führen. Der Nachteil eines verschiebblichen Deckglases, welches zu Schwierigkeiten beim Mikroskopieren in Ölimmersion führen kann, muß dabei in Kauf genommen werden. Die Aufbewahrung der Schnitte erfolgte dann im Kühlschrank oder im Gefrierfach, um ein zu schnelles Austrocknen und die damit verbundene Zerstörung des Befundes durch Luftblasen und Verschiebungen zu verhindern.

Die mikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Mikroskop "Orthoplan" der Firma Leitz mit der Möglichkeit von 32-, 80-, 200-, 320- und 800-facher Vergrößerung vorgenommen. Wesentliche Befunde wurden photographisch dokumentiert.

C. ERGEBNISSE UND BEFUNDE

SDH

Im menschlichen Gehirn besteht eine sehr gute Korrelation zwischen Kapillardichte und Mitochondrienzahl und damit auch eine Korrelation zur Aktivität oxidativer Enzyme (FRIEDE (7)). Die Kapillardichte in der Hirnrinde ist um ein Mehrfaches höher als in der weißen Substanz, deshalb ist es einleuchtend, daß sich, bei Darstellung dieser Enzyme, die Hirnrinde und ganz allgemein die graue Substanz schon rein makroskopisch deutlich von der weißen Substanz abgrenzen läßt. Der Quotient der Farbintensitätsunterschiede differiert jedoch für die einzelnen oxidativen Enzyme: Bei der SDH beträgt er ca. 5 : 1 im Verhältnis Rinde zu Mark, bei NADD und LDH ist er etwas niedriger.

Das betrifft auch die diffuse Färbung des Neuropils, d.h. aller zwischen den Perikarya der Ganglien- und Gliazellen liegenden Strukturen innerhalb der grauen Substanz unter Ausschluß der Gefäße. Demzufolge wird mit der SDH vorwiegend eine Färbung des Neuropils erreicht. Dies ist von großem praktischem Interesse, da Schäden im Neuropil mit konventionellen histologischen Färbungen nur schwer zu demonstrieren sind.

3.1. Der Normalbefund zeigt eine diffuse Färbung des Neuropils, die in den peripheren Schichten I bis IV etwas stärker ist als in den zentraleren Schichten V und VI. Deshalb ist bei der Beurteilung geringer Abblassungen Vorsicht geboten. Andererseits sind die Perikarya in den Schichten I bis IV praktisch nicht abzugrenzen, dagegen treten große Pyramidenzellen der V. Schicht etwas deutlicher hervor.

Was die Glia betrifft, so ist die Darstellung der Oligodendroglia insbesondere im Mark relativ gut, während die der Astrozyten kaum, die der Mikroglia überhaupt nicht gelingt.

Gefäße sind kaum anfärbbar, manchmal sind aber glatte Muskelzellen der Hirnarterien angefärbt. Das Ependym ist mässig, das

Plexusepithel sehr stark anfärbbar. Teilweise kommt es vor, daß zwischen Zelldichte und Enzymaktivität in der Rinde keine konstante Korrelation besteht, z.B. daß in kleinsten Bereichen maximale Enzymaktivität registriert wird und keine Perikarya vorhanden sind. Auch kann die Enzymaktivität zwischen Neuronen der gleichen Zellschicht unabhängig von der Zellgröße stark schwanken. Diese Feststellungen beziehen sich jedoch ausschließlich auf den Isocortex, Allocortexregionen sind jeweils anders zu beurteilen (FRIEDE 7).

3.1.1. Alle bisherigen Beobachtungen zeigten, daß das Neuropil wesentlich empfindlicher und verletzlicher bezüglich seiner Enzymaktivitäten ist als die Nervenzellen. Aktivitätsveränderungen im Neuropil sind also sehr empfindliche Indikatoren für Gewebsschädigungen ischämischer oder hypoxämischer Art. Auch sind Anteile des Gehirns mit hoher Rate an Gewebsatmung empfindlicher für anoxische Schäden, so daß z.B. die I. und III. bis V. Schicht im motorischen Cortex besonders starke Reaktionen zeigen (FRIEDE 7). Schädigungen bei cerebraler Arteriosklerose und in der Nachbarschaft cerebraler Tumoren zeigen eine umschriebene Aktivitätsverminderung von SDH und NADD (FRIEDE 7).

3.1.2. COLMANT (5) fand nach Erzeugung streng halbseitiger hypoxämischer Hirngewebsschäden im Tierversuch als früheste Veränderung nach 2 1/2 Stunden erstmals eine Abblassung des Neuropils verschiedenen Ausmaßes. Die verminderte Anfärbbarkeit war teilweise erst im Seitenvergleich erkennbar. Die Aktivität hypoxämisch veränderter Nervenzellen verschwand dagegen erst nach 48 Stunden völlig. Die Oligodendroglia zeigte keine bemerkenswerten Änderungen, die Mikroglia war erst nach mehreren Tagen aktiviert und dann nur geringfügig. KOZIK (13) fand bei experimentell erzeugter Hypoxie eine deutliche Abschwächung der SDH im Neuropil nach 10 Stunden, wobei er aber frühere Zeiten nicht untersuchte. Nach 72 Stunden beobachtete er nur noch minimale Aktivität. Bei Nervenzellen sah er nach 72 Stunden keinerlei Aktivität mehr.

SPECTOR (33) beobachtete im Cortex eine signifikante Abnahme der Isocitratdehydrogenase eine Stunde nach hypoxämischer Schädigung, nach 6 - 8 Stunden auch anderer Dehydrogenasen wie SDH und NADD.

3.1.3. KREUTZBERG und PETERS (15) untersuchten das Enzymverhalten nach experimentell erzeugtem Trauma, wobei sie bei Albino-Ratten mit einer sterilen Injektionsnadel aseptische Hirnwunden setzten. Daraus resultierte regelmäßig eine Verminderung jeglicher Fermentaktivität in Nervenzellen und Neuropil innerhalb des geschädigten Bereiches. Dieser Aktivitätsabfall sei früh aufgetreten, genaue Zeitangaben werden jedoch nicht gemacht. RUBINSTEIN u.a. (29) setzten mit einer auf minus 50° C gekühlten Stahlplatte Nekrosen an der Oberfläche von Katzenhirnen und fanden eine deutlich verminderte Aktivität. Dieser Aktivitätsschwund ging im Vergleich mit konventionellen Färbemethoden über den Nekrosebereich hinaus. Zeitangaben zum ersten Auftauchen dieser Veränderung fehlen jedoch auch hier. Nach 4 Tagen beobachteten die Autoren eine geringe Zunahme der SDH in reaktiven Astrozyten im benachbarten Marklager, die aber erst nach 42 Tagen deutlich positiv wurde. Diese Beobachtung steht auffällig im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Autoren, z.B. COLMANT.

SHIMIZU u.a. (31) experimentierten mit Stichwunden in den Cortex von Katzen und untersuchten die Befunde ab 6 Stunden bis zu 21 Tagen. Sie unterschieden, ähnlich wie RAEKALLIO (27) an den Hautwunden, eine konzentrische Wundzone, eine innere und äußere Verletzungszone und eine normale Schicht. Die SDH zeigte in der Wundzone kaum mehr Aktivität, in der inneren Verletzungszone eine geringe Abnahme gegenüber dem Normalbefund. Die Unterteilung in diese Zonen erscheint jedoch bei Betrachtung ihrer Photodokumentation etwas willkürlich.

Faßt man die Befunde der zitierten Autoren zusammen, so wird übereinstimmend von einer verminderten Anfärbung des Neuropils 2 - 3 Stunden nach dem jeweiligen Trauma berichtet, während eine Schädigung der Perikarya wesentlich später, nämlich nach 2 - 3

Tagen beobachtet wurde. An Reparationsvorgängen war das Enzym nur gering beteiligt. Wichtig ist, daß keine der beschriebenen Verletzungsarten den "Rindenprellungsherden" vergleichbar war.

3.2. Die Einteilung bezüglich der Latenzzeiten in 12 Gruppen ist in Tab. 1 (S. 22) wiedergegeben.

3.2.0.1. Gruppe 1: Sofortiger Todeseintritt

Die Blutungen waren bereits makroskopisch als Aussparung in der Grundaktivität erkennbar, wobei die Größe der Aussparung immer genau der Größe der Blutung entsprach, was wir an Nativpräparaten kontrollierten. Die Gesamtintensität war bei verletzten und unverletzten Arealen immer gleich.

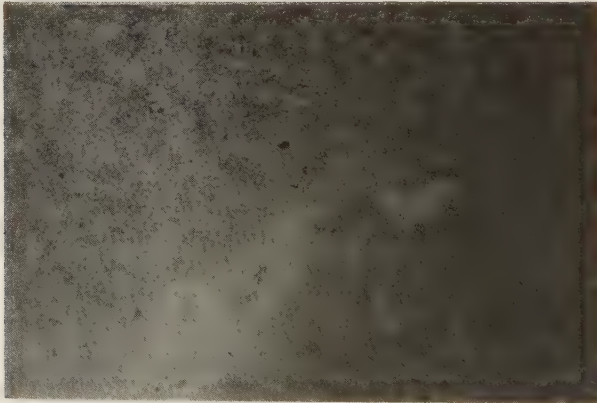
Mikroskopisch waren die Blutungen meist mehr verdrängend als infiltrierend. Nur bei infiltrierenden Blutungen fand sich am Rande der Blutung eine äußerst schmale Zone, in der die Aktivität der SDH abgeschwächt war oder fehlte. Diese Abschwächung war der Größe der Blutung in etwa korreliert und war deshalb nicht überall anzutreffen. Bei 2 größeren Blutungen war der Befund eindeutig zu erkennen (Abb. 1).

Abb. 1



Die Gefäße zeigten im Zentrum der Blutung oft eine intakte, teilweise auch zerstörte Struktur bei normaler Aktivität, auch die Nervenzellen zeigten bis an den Rand der Blutung und in der abgeschwächt anfärbbaren Zone normale Aktivität. Manchmal konnte eine schmale, abgeschwächte Zone direkt unter der Pia mater, meist in engem örtlichem Zusammenhang mit den Blutungen, seltener auch bei den unverletzten Vergleichspräparaten, festgestellt werden (Abb. 2), was im Zusammenhang mit akutem Hirndruck auftreten könnte.

Abb. 2



Nachdem jedoch auf deutlich schräg zur Rindenoberfläche geführtem Schnitt die schon normalerweise leicht abgeschwächt anfärbbare, sehr schmale Zone deutlich verbreitert erscheinen kann, möchten wir diese Beobachtung auch als Artefakt diskutieren. Ein Vergleich mit kresylgefärbten Präparaten bestätigte dies.

3.2.0.2. Gruppe 2: - 1 h Überlebenszeit

Das Bild entsprach im wesentlichen dem der 1. Gruppe. Lediglich die Infiltrationszonen erschienen regelmäßiger und insgesamt minimal breiter.

3.2.0.3. Gruppe 3: 1 - 2 h Überlebenszeit

Auch hier konnten die Blutungen makroskopisch nicht eindeutig von den vorgenannten Gruppen unterschieden werden. Mikroskopisch sah man abgeschwächte Randsäume deutlicher hervortreten. Neben normal angefärbten Nervenzellen in den Blutungszentren waren auch leicht abgeblaßte Zellen festzustellen, wobei jedoch eine sichere Abgrenzung wegen der Variationsbreite der Intensität kaum möglich ist. Hinzu kommt, daß bei kleineren Blutungen solche Unterschiede gegenüber kürzeren Überlebenszeiten fehlen.

Bei stärkster Vergrößerung (1 : 800) sahen wir in einem Falle Nervenzellen, deren Kern randständig war und die eine grobtropfige Aktivität aufwiesen, wobei aber eine Aktivierung der SDH in einzelnen Nervenzellen nicht sicher nachweisbar war.

3.2.0.4. Gruppe 4: 2 - 4 h Überlebenszeit

Makroskopisch war in einem Teil der Fälle ein leicht aufgehellter Randsaum erkennbar, in anderen Fällen dagegen nicht. Die Gesamtintensität blieb gleich.

Mikroskopisch nahm bei größeren Blutungen die Breite der abgeschwächten Intensität zu, ebenso fanden sich häufiger schwächer angefärbte Nervenzellen, doch waren diese Befunde wiederum von der Blutungsgröße abhängig oder fehlten teilweise völlig.

3.2.0.5. Gruppe 5: 4 - 6 h Überlebenszeit

Makroskopisch war hier die Aussparung der Aktivität durch die Blutungen immer mehr oder weniger deutlich überschritten, die Gesamtintensität blieb jedoch weiterhin gleich.

Mikroskopisch konnte man nunmehr einheitlich eine herabgesetzte Anfärbbarkeit des Neuropils am Rande der Blutungen beobachten, sowohl bei kleineren als auch bei größeren Blutungen. Die Nervenzellen waren im Randsaum der Blutung öfter blaß gefärbt, im Zentrum meist nicht mehr darstellbar. Wie bei der vorher geschilderten Aktivitätsverminderung an korrespondierenden Stellen unter der Pia mater war in dieser Gruppe ein Fall, in dem dies besonders deutlich erkennbar war.

3.2.0.6. Gruppe 6: 6 - 13 h Überlebenszeit

Makroskopisch war in dieser Gruppe bei größeren Blutungen eine deutliche Aussparung der Enzymaktivität zu registrieren, während sie bei kleineren Blutungen kaum wahrnehmbar war.

Mikroskopisch traten die Aufhellungen um die Blutungen deutlicher hervor als hisher. In den Blutungen waren keine Nervenzellen mehr anfärbbar, im Randsaum waren sie deutlich abgeschwächt angefärbt. Multiple kleine Blutungen zeigten eine eher großflächige, leichte Aufhellung. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß in einem Falle mit einer sehr kleinen, wenig verdrängenden Blutung kein vermindert anfärbbarer Randsaum vorlag.

3.2.0.7. Gruppe 7: 12 - 24 h Überlebenszeit

Diese Gruppe brachte keine signifikanten Unterschiede gegenüber der vorigen.

3.2.1.0. Gruppe 8: 1 - 2 d

Die Blutungen waren jetzt deutlich demarkiert und mit schmalen, aufgehellten Randsäumen umgeben und es konnten auch großflächige Abblassungen um die Blutung beobachtet werden. In 2 Fällen war die Gesamtintensität gegenüber unverletzten Kontrollschnitten vermindert.

Mikroskopisch waren die Blutungszentren ohne jede Aktivität und umgeben von schmalen Randsäumen mit Nervenzellen mit herabge-

setzter Aktivität (Abb. 3), z.T. waren Nervenzellen jedoch bis an den Rand mit einer normalen Enzymaktivität versehen.

Abb. 3



3.2.1.1. Gruppe 9: 2 - 4 d

Makroskopisch sah man bereits eine deutliche, großflächige Abschwächung der Umgebungsaktivität um die ausgesparten Blutungen. Nur Rindenanteile, die durch ein Windungstal von den Verletzungsbereichen abgetrennt waren, waren annähernd normal gefärbt.

Mikroskopisch war weiterhin eine deutlichere Abschwächung der Aktivität um die Blutungen vorhanden und in diesen Bereichen kaum mehr Nervenzellen anfärbbar. In einem Fall tauchte eine tropfige zelluläre Aktivität auf, die in der NADD den Astrozyten entsprach, sich in anderen Präparaten jedoch nicht so eindeutig feststellen ließ.

3.2.1.2. Gruppe 10: 4 - 6 d

In dieser Gruppe waren in den Zonen abgeschwächter Aktivität überhaupt keine Nervenzellen mehr anfärbbar.

3.2.1.3. Gruppe 11: 6 - 15 d

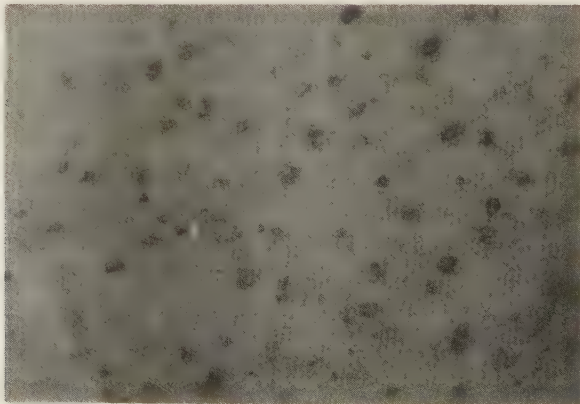
Makroskopisch sah man jetzt eine deutliche Aussparung der Blutung mit deutlicher umgebender Aufhellung.

Mikroskopisch trat erstmals eine Randwallbildung aus Gefäßen auf, die, wie normalerweise, kaum gefärbt waren und aus Zellen mit tropfiger Enzymaktivität. Nach Vergleich mit anderen Färbungen und aus der Form der Zellen geht hervor, daß es sich dabei um Astroglia und Abraumzellen handelt (Abb. 4). Diese demarkierenden Randwälle zeigten sich besonders deutlich als Abgrenzung gegen das Mark. Das Neuropil war um diesen Randwall breit abgeschwächt, Nervenzellen darin kaum darstellbar.

3.2.1.4. Gruppe 12: länger als 15 d

Nach mehr als 15 Tagen waren keine weiteren Entwicklungen mehr erkennbar, lediglich im Marklager fanden sich gehäuft Astrozyten, die plumpe, granuläre Aktivität aufwiesen.

Abb. 4



3.3. NAD-abhängige Diaphorase NADD)

Normalerweise zeigt die NADD am Gehirn eine diffuse Färbung des Neuropils, die Nervenzellen sind sehr deutlich in allen Schichten dargestellt, besonders deutlich die Pyramidenzellen. Deutliche Aktivität zeigen auch die Gefäße und die Oligodendroglia, weniger deutlich die Astrozyten, und die Mikroglia zeigt nur eine schwache Aktivität. Wie bei der SDH besteht auch hier keine Abhängigkeit von Nervenzellgröße und Aktivität. Es gibt auch keine "solitary active cells", wie sie von THOMAS und PEARSE (35) für die Diaphorase II beschrieben wurden, obwohl immer einige Nervenzellen vorhanden sind, die besonders deutlich gefärbt sind.

3.3.1. COLMANT (5) fand bei experimentell hervorgerufenen Ischämien schon nach 2 Stunden eine diffuse Aufhellung in unterschiedlicher Ausprägung. Die Gefäße waren nicht verändert. An den Ganglienzellen beobachtete er eine Minderung der Aktivität erstmals nach 10 Stunden, völlig verschwunden war die Aktivität aber erst nach 29 Stunden. Achsenzyklinderschwellungen sah er erstmals nach 13 Stunden. Die Astrocyten waren unter den Gliazellen am auffälligsten: sie erschienen bereits nach 13 Stunden am Herdrand aktiviert. Diese Steigerung der Enzymaktivität ist jedoch vorübergehend, sie ist nach einigen Wochen zurückgebildet. Die Mikroglia hatte nur schwache Enzymaktivität, die Oligodendroglia war unverändert.

3.3.2. KOZIK (13) sah bei der chronischen hypoxämischen Nervenzellschädigung nur noch eine schwache Aktivität in den Nervenzellen. Bei der akuten ischämischen Schädigung beobachtete er einen Intensitätsverlust im Neuropil nach 10 Stunden, der nach 3 Tagen soweit fortgeschritten war, daß nur noch eine minimale Aktivität anzutreffen war, einschließlich einer nur noch schwachen Färbbarkeit der Perikarya.

SPECTOR (34) konnte bei ischämischen Hirngewebsschäden erst nach 6 - 8 Stunden eine Abschwächung der NADD in der Rindenschicht feststellen. Er sah eigenartigerweise nach 18 - 24 Stun-

den selektiv in der III. Schicht bestimmter Rindenareale einen Verlust der Anfärbbbarkeit von Neuropil, Nervenzellen und Gliazellen.

3.3.3. Traumatische Hirngewebsläsionen wurden von KREUTZBERG und PETERS (15) untersucht. Sie beobachteten innerhalb von 6 Stunden posttraumatisch im geschädigten Gewebsbereich eine Verminderung der NADD-Aktivität in Nervenzellen und Neuropil. Weiter berichten sie, daß nach 6 Stunden kugelig und birnenförmig aufgetriebene, geschwollene Axonstümpfe auftraten; dieser Befund konnte auch in der Versilberung verifiziert werden. Nach 3 - 4 Tagen war dann allerdings die Zahl nachweisbarer Axonschwellungen herabgesetzt, während die Schwellungen selbst bis zu 3 Wochen erhalten blieben. Nach 48 Stunden kam es an den Gefäßen in der grauen Substanz zu Zellschwellung und -ablösung. Gleichzeitig erfolgt auch eine Reaktion von Mikro- und Makrogliazellen. Am 4. bis 5. Tag tauchten massenhaft Fettkörnchenzellen sowie progressiv veränderte Mikroglia und proliferativ veränderte Astrozyten auf. Auch Gefäßsprossung war erkennbar, diese jedoch stärker bei Darstellung der Diaphorase II. Eine Randwallbildung aus den genannten Zellelementen zeigte sich nach ca. 7 Tagen, eine Abnahme der Gesamt-Enzymaktivität der Diaphorase II (NADPD) ab dem 6. Tage. Nach 2 - 4 Wochen persistierte die Intensität, vor allem in den Astrozyten bis ca. 6 Wochen nach dem Trauma. Zur Erklärung diskutieren die Autoren, daß aus der Aktivitätszunahme der Oxidoreductasen auf einen hohen Energiebedarf zu schließen sei. Da normale Astrozyten nur einen geringen oxidativen Stoffwechsel haben (FRIEDE 7), kennzeichnet dieser hohe Energiebedarf die reparativen Leistungen der Makro- und Mikroglia, die bei der Vermehrung und Volumenzunahme und speziell bei der Faserbildung sehr viel Energie aufbringen müssen. Die Aktivitätszunahme der NADPD, die aus dem Pentose-phosphat-Shunt stammt, deutet also auf eine hohe Syntheserate der Makro- und Mikroglia hin (KREUTZBERG 16).

RUBINSTEIN u.a. (29), die bei ihren Versuchen die Hirngewebschädigung mittels Kälte hervorriefen, berichten, ähnlich wie bei der SDH, über eine Abschwächung der Anfärbbbarkeit bis zum

völligen Verlust, die über den eigentlichen Nekrosebereich hinausging. Axonschwellungen sahen sie nie. Bereits nach 12 - 24 Stunden bemerkten sie eine deutliche Reaktion der Astroglia, die im Gegensatz zu den Ergebnissen von KREUTZBERG u.a. Untersuchern (15) zuerst die NADD betraf. Nach 4 Tagen zeigte die NADD eine sehr deutliche Intensitätszunahme, während dies bei der NADPD erst nach 14 Tagen feststellbar war. Diese Aktivitätszunahme betraf aber nur Astrozyten in dem der Schädigung benachbarten Markabschnitt, während in der Schädigungszone selbst erst nach 14 Tagen eine gleichartige Reaktion der Astroglia vorlag. Einen ähnlichen Unterschied der Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von der Lokalisation beobachteten die Autoren bei der Mikroglia. Während im benachbarten Mark nach 24 Stunden eine Wucherung der Mikroglia mit einem Maximum um den 4. Tag gesehen wurde, die sich nur mit NADD anfärben ließ, war im geschädigten Bezirk selbst eine Mikrogliareaktion nur mit NADPD nachweisbar. Eine Erklärung für dieses Phänomen haben die Autoren nicht.

Zusammenfassend kann man daher aus der Literatur feststellen, daß nach experimentell-traumatischen Schäden eine Abschwächung im Neuropil frühestens nach wenigen Stunden auftreten kann, eine deutliche Aktivierung der Glia, und hier vor allem der Astrozyten, nach ca. 4 Tagen beginnt und Wochen erhalten bleibt, und eine Randwallbildung aus Glia und Abräumzellen nach 7 Tagen auftaucht.

3.4. Eigene Ergebnisse

3.4.1. Gruppe 1: Sofortiger Todeseintritt

Makroskopisch war der Befund völlig identisch mit dem bei der SDH beschriebenen, nämlich eine Aussparung der Blutungen wie im Nativpräparat bei ungestörter Gesamtintensität. Auch mikroskopisch ergab sich ein gleicher Befund bezüglich der Abschwächung eines Randsaumes, der nur bei größeren, infiltrierenden Blutungen vorlag. Die Aktivität der Gefäße unterschied sich nicht von unverletzten Gewebssausschnitten. Die Nervenzellen waren gut und

ohne Veränderung der Aktivität dargestellt. Im Gegensatz zur SDH waren bei der NADD jedoch deutliche Zeichen der direkten, mechanischen Schädigung erkennbar. So fanden wir Axonabrisse (Abb. 5) und eine granuläre Freisetzung von Aktivität um die Zelleiber (Abb. 6). Bevorzugt waren diese Beobachtungen im Bereich großer, infiltrierender Blutungen zu machen. Diese granuläre, extrazelluläre Enzymaktivität kann als Folge der mechanischen Schädigung der Membran aufgefaßt werden. Da sie auch bei längeren postmortalen Liegezeiten auftrat, ist der Enzymaustritt bei postmortaler Funktionsstörung der Zellmembran diesem Geschehen vergleichbar und bietet Anlaß zu Verwechslungen. Wir konnten jedoch bei vitalen Fällen um die Blutungen eine signifikante Häufung solcher Aktivitätsveränderungen feststellen, auch waren die Veränderungen hier ausgeprägter im Vergleich zu entfernter gelegenen Nervenzellen. Manchmal fiel uns eine Abschwächung der Aktivität des Neuropils in der periphersten Zone der Molekularschicht auf (Abb. 7). Wir sind in der Bewertung dieses Befundes jedoch ebenso zurückhaltend, wie bei der Beobachtung einzelner, vermeintlich aktivierter Nervenzellen, da die Variationsbreite der Farbtintensität Artefakte hier nicht ausschließen läßt.

Abb. 5

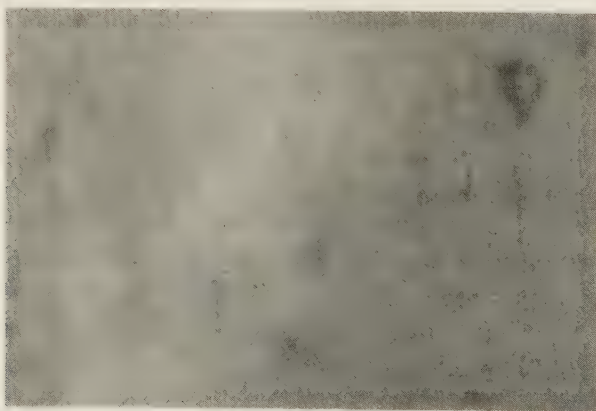
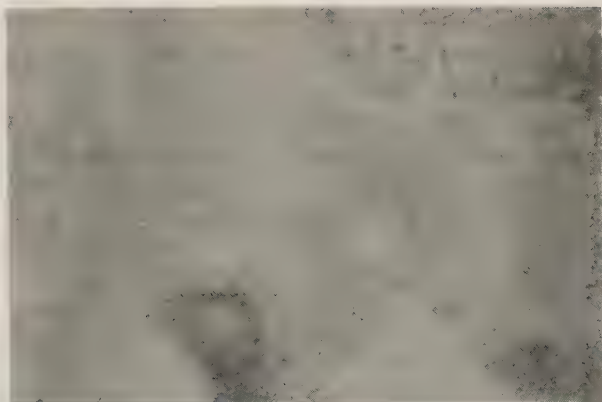
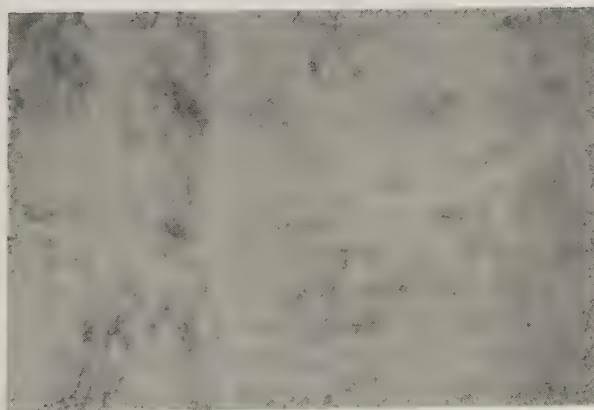


Abb. 6Abb. 7

3.4.2. Gruppe 2: 0 - 1 h

Gegenüber den Fällen von sofortigem Tod waren die Überlebenszeiten bis zu einer Stunde weder makroskopisch noch mikroskopisch eindeutig abzugrenzen. Subjektiv waren die granulär freigesetzten Enzyme ausgeprägter und deutlicher als in der 1. Gruppe und fanden sich in breiteren Säumen um die Blutungen und auch um die Gefäße. Die Nervenzellen erschienen in größeren Blutungen mit starker Infiltration etwas blasser.

2.4.3. Gruppe 3: 1 - 2 h

Auch hier waren keine wesentlichen neuen Gesichtspunkte für die zeitliche Abgrenzung hinzugetreten. Die Säume granulärer Aktivität um die Nervenzellen waren etwas deutlicher erkennbar, auch in einiger Entfernung vom Blutungszentrum. In einem Falle war in den Astrozyten in Blutungsnähe ein tropfenförmiges blaues Aktivitätsmuster zu sehen.

3.4.4. Gruppe 4: 2 - 4 h

Neue Aspekte ergaben sich insofern, als mikroskopisch in jedem Fall eine Abblassung im Neuropil erkennbar war, die über den reinen Blutungsbezirk hinausging. Im Blutungsbezirk waren die Nervenzellen ebenfalls in ihrer Intensität deutlich abgeschwächt, teilweise nur noch als Schatten erkennbar. Die Gefäße waren z.T. erhalten, z.T. zerstört mit freigesetzter, granulärer Aktivität. In den Randsaumbezirken mit abgeblaßtem Neuropil sahen wir gleichartig geschädigte Nervenzellen. In einem Fall mit multiplen kleinen Blutungen in der Rinde war es zu einer großflächigen, zusammenfließenden Aufhellung im Neuropil gekommen. Im Anschluß an diese Aufhellung erschienen einige Nervenzellen aktiviert, wobei auch hier auf die Schwierigkeit der Beurteilung durch das Auge hingewiesen werden muß, da dieser Eindruck durchaus eine Frage des Farbkontrastes sein kann. Bei den Astrozyten waren zwar Nuancen einer zunehmenden Aktivierung vorhanden, jedoch nicht in einem objektivierbaren Grade. Dies war auch manchmal im benachbarten Rindental zu beobachten.

3.4.5. Gruppe 5: 4 - 6 h

Gegenüber der vorherigen Gruppe war wiederum nur eine quantitative Änderung erkennbar. Die Abschwächung des Neuropils in den Randsäumen, der granuläre Enzymaustritt um die Gefäße und die Schädigung der Nervenzellen nahmen zu. In den Blutungszentren waren jetzt, wenn überhaupt, nur noch Schatten von Ganglienzellen erkennbar (Abb. 8). In den Randgebieten war die granuläre Enzymfreisetzung großflächiger, die Konturen der Nervenzellen unscharf.

Abb. 8

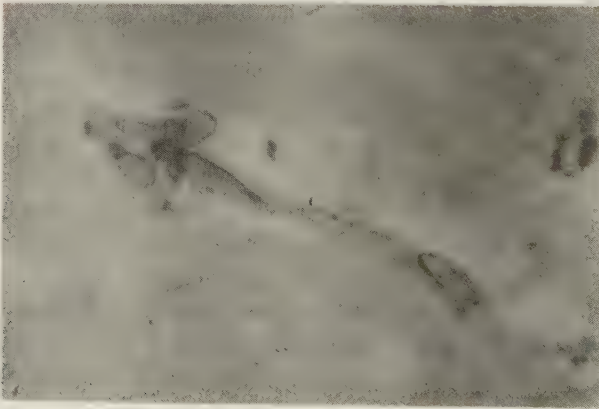


3.4.6. Gruppe 6: 6 - 13 h

Makroskopisch war, neben einer Randsaumbildung abgeschwächter Aktivität, die Gesamtintensität gleich. Mikroskopisch waren die Nervenzellen im Blutungsbereich praktisch nicht mehr anfärbbar. An den Gefäßen waren unterschiedliche Befunde zu erheben, teils war die Anfärbung normal, teils abgeschwächt. Meistens fanden sich wie schon vorher granuläre Enzymmuster um die Gefäße. Der wesentlichste Befund war, daß in dieser Gruppe alle Blutungen,

auch kleinere, von einer Zone abgeblaßten Neuropils umgeben waren, die in ihrer Ausdehnung wiederum von der Größe der Blutung abhängig war. Bei multiplen Blutungen war es auch zu großflächigen Abschwächungen der Intensität gekommen. In diesen Zonen abgeschwächter Aktivität beobachteten wir granuläre Enzymmuster um die Nervenzellen, während die Aktivität in den Zellen selbst herabgesetzt war und die Zellgrenzen verwaschen wirkten. Bei stärkerer Vergrößerung sah man die Enzyme in Form kleiner Tropfen an den Rand der Perikarya gedrängt, während der Kern gelblich, geschwollen erschien. Normale Nervenzellen waren erst in beträchtlichem Abstand von den Blutungen aufzufinden und manchmal hatte man den Eindruck einer Aktivitätssteigerung, wobei aber auf die Problematik dieser dunkleren Anfärbungen schon eingegangen wurde. Die Gefäße waren in Blutungsnähe manchmal blasser angefärbt, in einem Fall waren geschwollene Endothelien erkennbar, die sich abzulösen schienen (Abb. 9). Astrozyten zeigten keine auffälligen Veränderungen gegenüber der vorigen Gruppe.

Abb. 9



3.4.7. Gruppe 7: 13 - 24 h

In 2 von 3 Fällen lag makroskopisch eine Abschwächung der Gesamtintensität vor, verglichen mit den unverletzten Präparaten. Sonst waren makroskopisch und mikroskopisch keine neuen Kriterien zur zeitlichen Gruppenabgrenzung feststellbar.

3.4.8. Gruppe 8: 1 - 2 d

Auch in dieser Gruppe traten keine neuen Gesichtspunkte einer Schädigung oder Veränderung auf.

3.4.9. Gruppe 9: 2 - 4 d

Makroskopisch war weniger eine Randsaumbildung um die Blutungen, als eine Abblassung der gesamten Verletzungszonen vorhanden. Mikroskopisch waren im Blutungsbereich keine Zellen mehr anfärbbar, dagegen fanden wir z.T. noch staubförmig geformte Enzymmuster. Auch Gefäße waren z.T. nicht mehr anfärbbar, zeigten aber eine staubförmige Enzymaktivität. Das Neuropil war nur in einem Falle noch in Form eines Randsaumes abgeschwächt angefärbt, in allen anderen Fällen bestand eine großflächige leichte Aufhellung, in deren Einzugsgebiet die Nervenzellen meist insgesamt ebenfalls blaß angefärbt waren. In einem Falle waren die Gefäße am Rande einer Blutung vermehrt, ohne daß festzulegen war, ob es sich nicht um relative Vermehrung handelte, bedingt durch die Auflockerung des verletzten Gewebes. Ein außerordentlich wichtiger Befund war die scharfe zeitliche Abgrenzung des Auftretens einer Aktivitätszunahme in den Astrozyten. 4 Präparate mit Überlebenszeiten bis zu 4 Tagen waren völlig unauffällig, während ab 4 1/2 Tagen eine deutliche Veränderung dergestalt erkennbar war, daß die Zellfortsätze verkürzt, aber kräftiger waren, und der Zelleib sich vergrößerte. In einem noch eine Stunde älteren Präparat war auch die Lokalisation dieser Veränderungen sehr gut festzulegen, sie betraf das Verletzungsnahemark und die der Pia mater benachbarte Region der Molekularschicht. Dabei ist noch hervorzuheben, daß in diesem Präparat an einem Rindental erkennbar wurde, daß nur die Astrozyten der Verletzungsfernen Molekularschicht reagierten (Abb. 10).

3.4.0.1. Gruppe 10: 4 - 6 d

Makroskopisch ergab sich bei multiplen kleineren Blutungen eine eher großflächige Aufhellung, während größere, einzelne Blutungen einen aufgehellten Randsaum aufwiesen.

Mikroskopisch war in den ausgesparten Blutungen keine Zelle mehr dargestellt, lediglich Reste staubförmiger Aktivität waren vorhanden. Die Gefäße waren teilweise erhalten, z.T. ebenfalls von staubförmiger Aktivität umgeben. Am Rande der Blutung bestand manchmal ein breiter Wall aus diffuser, staubförmiger Aktivität oder eine abgeblaßte Zone ohne Zellen und Gefäße. Daran schloß sich praktisch immer eine wallartige Abgrenzung an, die aus tropfenförmig auftretender Enzymaktivität, Gefäßen mit geschwellenen Endothelien und - bei Blutungen in Marknähe - einer Zone aktivierter Astrozyten bestand. Man konnte praktisch von einer Demarkierung der Blutung durch Astroglia sprechen. Der Befund unterschied sich von der vorhergehenden Gruppe in Größe, Anzahl und Aktivität der Astrozyten. (Abb. 11) In Rindentälern fanden wir eine leichte schmale Abschwächung der Intensität unter der Pia mater mit deutlicher Astrozytose, vor allem auf der der Blutung zugewandten Seite. Nervenzellen fehlten in diesem Randwall, jenseits von ihm waren bis in die Tiefe des Gewebes geschädigte Exemplare feststellbar mit umgebender granulärer Enzymaktivität. Daneben waren aber auch durchaus unveränderte Nervenzellen, jedoch nicht im Sinne von "solitary active cells". Wichtig scheint uns die Feststellung, daß auch im unverletzten Präparat, begrenzt auf die Kuppen und Windungstäler, sich eine Aktivierung der Astroglia abzeichnete, die die obersten Schichten umfaßte. Manchmal war auch eine Aufhellung des Neuropils erkennbar. Wir sehen darin eine Reaktion auf den Hirndruck infolge des Hirnoedems.

Abb. 10

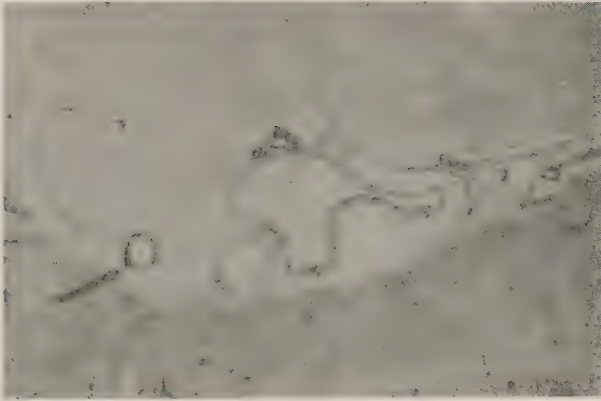
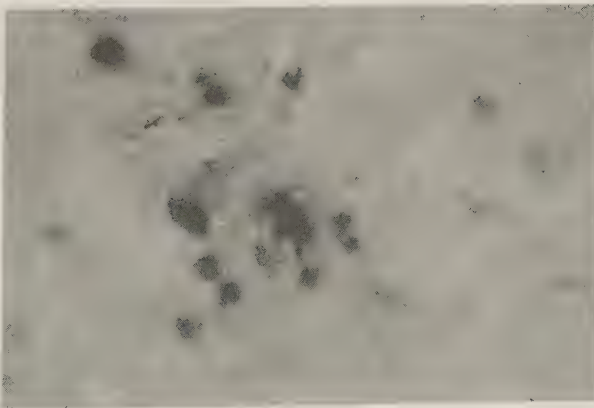


Abb. 11



3.4.0.2. Gruppe 11: 6 - 15 d

Die Randwallbildungen waren jetzt schon makroskopisch erkennbar.

Mikroskopisch zeigt sich, daß der Randwall aus gewucherten Gefäßen mit geschwollenen Endothelien, aktivierten Astrozyten und Abräumzellen besteht, mit einer Anhäufung grobgranulärer Enzymaktivität intrazellulär zum Blutungszentrum hin und diffus verteilter grobtropfiger Aktivität im Randwall. Die Astrozytose war besonders deutlich an der Mark-Rindengrenze, fand sich jedoch auch über das ganze Präparat verteilt und vor allem um Gefäße gruppiert. Nervenzellen waren meist nicht mehr nachweisbar und wenn, dann überwiegend schattenhaft. Sehr selten sahen wir noch Nervenzellen, die erhalten waren. Bei starker Vergrößerung zeigten sich die Astrozyten an der Mark-Rinden-Grenze überwiegend als protoplasmatische Formen, während sich in der Molekularschicht mehr faserbildende Formen mit feinen, langen Fortsätzen zu den Gefäßen fanden. Auch in dieser Gruppe waren in den unverletzten Ausschnitten gleichartige Veränderungen, wie in der vorigen Gruppe geschildert, anzutreffen.

3.4.0.3. Gruppe 12: 15 d

Wurden die Verletzungen mehr als 15 Tage überlebt, so ergaben sich nur mehr geringe quantitative Abweichungen. Die Astrozytose erstreckte sich jetzt jedoch über das ganze Präparat, wobei die Astrozyten häufiger von einem Saum granulärer Aktivität umgeben waren. Völlig aus der Reihe fiel ein Präparat mit vierwöchiger Überlebenszeit nach apallischem Syndrom, bei dem die gliöse Reaktion sehr stark war, die mesenchymale Reaktion aber praktisch fehlte.

D. ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION

4. Neben der exakten Bestimmung des Todeszeitpunktes ist die Wundaltersbestimmung eines der zentralen Probleme der Rechtsmedizin. Während es jedoch für die Bestimmung des Todeszeitpunktes zahlreiche Untersuchungen und Ansatzpunkte gibt, blieb die Wundaltersbestimmung etwas im Hintertreffen. Die lange Zeit übliche und auch heute im Wesentlichen praktizierte Methode der Beschreibung des äußeren Aspekts von Hautwunden und der histologischen Leukodiapedese wurde erst durch RAEKALLIO (27) und PIOCH (26) auf neue Methoden und Verfahrensweisen erweitert, die exaktere Ergebnisse lieferten. So ist es erstaunlich, daß dieser Anregung nicht schon früher nachgegangen wurde und die Enzymhistochemie nicht auf andere Organe oder speziell Rindenprellungsherde ausgedehnt wurde.

Trotz der umfassenden neuropathologischen Fachliteratur gab es bis jetzt auch kaum histologische Untersuchungen, die auf zeitliche Grenzwerte abzielten. Es gibt eine Vielzahl von Einzelbeobachtungen, deren grundlegende Zusammenfassung und Tabellierung im Sinne einer zeitlichen Abstufung meines Wissens bis jetzt noch nicht erfolgt war. Im Rahmen der Übersichtsarbeit sollte jetzt u.a. eine Tabellierung der zeitlichen, histologisch faßbaren Veränderungen erfolgen, mit Berücksichtigung einer mit an Sicherheit grenzenden Wahrscheinlichkeit, wie sie in foro gefordert wird. Deshalb erfolgte auch eine Unterteilung im Sinne von: Erstes Auftreten - stetiges Auftreten von Veränderungen.

Die mit maximal 5 einfachen Färbemethoden durchführbare Routinehistologie brachte bereits viele Ergebnisse und Anknüpfungspunkte zur Überlebenszeitbestimmung, die hier bis ins einzelne nicht diskutiert werden können. Zum Vergleich mit Ergebnissen der Enzymhistochemie seien nur folgende Resultate angeführt: Ein stetiges Auftreten von intrazellulärem Formalinpigment als Ausdruck einer Zellwandschädigung an Nervenzellen wurde nach 1 - 3 Stunden beobachtet, ein Verschwinden dieser Erscheinung

ab dem 2. - 3. Tag. Gemästete Glia trat regelmäßig ab dem 13. - 14. Tag auf, eine Gefäßproliferation bereits ab dem 7. - 8. Tag.

Insgesamt läßt sich sagen, daß allein mit der Routinehistologie bereits eine sehr gute Abgrenzung und zeitliche Abstufung möglich ist. Unser Ziel war jedoch, weitere Anknüpfungspunkte zu finden, die mit einfachen Methoden insgesamt eine umfassendere und eventuell genauere Darstellung gewährleisten sollten. Das hatten wir uns von der Anwendung enzymhistochemischer Methoden an Hirnwunden versprochen.

4.1. Unsere Idee war dabei, daß bei gedeckten Rindenprellungsherden zuerst ein Gefäßwandschaden mit Rhexisblutungen ins umliegende Gewebe wie auch eine direkte Schädigung der Nervenzellen mit Membranschäden und Zellfortsatzabrissen erfolgen muß. Das lokale Ödem führt zu einer Kompression der Gefäße, zum Sauerstoffmangel und zur Umstellung des Stoffwechsels auf anaerobe Glykolyse. Die dabei entstehende lokale Azidose führt zur Aktivierung eiweißverdauender Enzyme (Kathepsine). Die erhöhte Osmolarität führt zum Einstrom von Gewebsflüssigkeit und bedingt eine weitere Zunahme des Ödems. Da all diesen Veränderungen biochemische Mechanismen zugrunde liegen, sollte die histochemische Darstellung von verminderter oder verstärkter Enzymaktivität Schädigungsmuster und reparative Gewebsveränderungen frühzeitig erfaßbar machen. So sollte die SDH Auskunft über die Aktivität des Citratzyklus, seine Verbindungen mit der Atmungskette und über den aeroben Stoffwechsel geben, die NADD über die intrazelluläre Oxidationskapazität.

Die sich ergebenden Veränderungen beruhten im wesentlichen auf einer verminderten, erst bei Reparationsleistungen auf einer verstärkten Anfärbbarkeit. Sie waren meist quantitativer Art und damit von subjektiven Eindrücken oder Vergleichen abhängig, zudem auch noch von der Größe der Blutung. Wenn man auf die Grenzwertanforderungen in foro eingeht, resultieren daraus natürlich erhebliche Schwierigkeiten. Insgesamt wurden die in die enzymhistochemischen Untersuchungen (hier speziell SDH und NADD) gesteckten Erwartungen demnach nicht voll erfüllt, im Gesamt-rahmen ergaben sich jedoch eine ganze Anzahl von zusätzlichen Gesichtspunkten.

4.2. Bei der SDH ergab sich in Einzelfällen bei sofortigem Tod, besonders wenn die Blutungen größer und stark infiltrierend waren, eine Abschwächung der Enzymaktivität des Neuropils über die reine Aussparung der Blutung hinaus. Damit ist zumindest die Möglichkeit gegeben, einen zusätzlichen Beweis für eine vitale Reaktion zu erheben. Eine konstant auftretende, einheitliche Abschwächung trat jedoch erst nach 4 Stunden Überlebenszeit auf. Dies stimmt mit den Beobachtungen anderer Autoren an freilich nicht entsprechenden Versuchen überein, die von einer verminderten Anfärbbarkeit nach 2 - 3 Stunden berichten. Die Enzymaktivität der Perikarya ist nicht so leicht irritabel wie im Neuropil. Abgeschwächt anfärbbare Nervenzellen in der Blutung waren erstmals nach mehr als einer Stunde feststellbar, ein konstanter Schwund der Nervenzellen jedoch erst nach 6 - 13 Stunden. Die oben genannten Autoren berichteten von einer Schädigung der Perikarya erst nach 2 - 3 Tagen, jedoch an Verletzungsarten, die wie gesagt den Rindenprellungsherden nicht direkt vergleichbar waren. Ein wesentlicher Punkt ist der Schwund der Perikarya im Randsaum der Blutung, erstmals ab dem 2. - 4. Tag, konstant nach 4 - 6 Tagen. Man muß hierzu sagen, daß Nervenzellen bei der SDH im Gegensatz zur NADD nur relativ schwach dargestellt sind und deshalb eine objektive Beurteilung zumindest einen geübten Blick erfordert.

Die Schädigung des Enzymstoffwechsels der SDH sind damit erschöpft. Eine Aktivitätssteigerung im Sinne von reparativen Leistungen an Nervenzellen war nicht zu beobachten und nach KREUTZBERG (17) auch nicht zu erwarten, wohl aber an Abräumzellen und gemästeter Glia. Diese Zellen müssen ja bei der Reparation vermehrt Leistungen und Energie aufbringen, da besonders die Phagocytose mit einem großen Umsatz an Fermenten einhergeht. Wir fanden dementsprechend erstmals nach 6 Tagen Überlebenszeit Abräumzellen in Randwallbildung mit einer Aktivitätssteigerung in granulärer bis tropfiger Form. Erwartet hatten wir dies allerdings zu einem früheren Zeitpunkt und hatten gehofft, daß sich Abräumzellen mit Hilfe der Enzymhistochemie früher differenzieren ließen als in der Histologie. Offenbar ist die Aktivität im Citratzyklus bis zur Ausdifferenzierung dieser Zellen nicht

so auffällig gesteigert wie beispielsweise bei der NADD (oder nach Literaturangaben besonders bei der NADPD).

Zusammenfassend kann man sagen, daß die SDH eine relativ frühe Reaktion im Neuropil zeigt, die Darstellungsmöglichkeit der Nervenzellen und Gliazellen in ihrer geringen Reaktion bezüglich Schädigung und Reparation jedoch eingeschränkt ist.

4.3. Die NADD schien uns deshalb zur zeitlichen Grenzwertbestimmung besser geeignet, da hier die Nervenzellen sehr gut dargestellt sind. Zusätzlich zur konstant auftretenden Abschwächung des Neuropils nach 2 - 4 Stunden treten hier weitere Gesichtspunkte hinzu, die als Zeichen einer vitalen Reaktion zu werten sind. So konnten wir die Freisetzung von Enzymaktivität in granulärer Form um die Perikarya im Blutungsbezirk feststellen. Gleiche Befunde waren allerdings auch nach längerer postmortaler Liegezeit zu beobachten, so daß diese Freisetzung als Folge einer Membranschädigung (vgl. das Auftreten von Formalinpigment) zu werten ist, einmal als direkte mechanische Schädigung, zum andern im Rahmen der Nekrose und Nekrobiose. Eine Abgrenzung dieser beiden Möglichkeiten ist damit praktisch nur durch Vergleich von verletzten und unverletzten Gewebsstücken möglich, da nur dann eine signifikante Häufung im Blutungsbereich bzw. ein Fehlen derartiger Veränderungen im unverletzten Präparat als Zeichen einer vitalen Reaktion brauchbar ist.

Die gute Darstellung der Perikarya und ihrer Fortsätze ermöglicht auch die Darstellung von Abrissen dieser Fortsätze, möglicherweise mit einer deutlich sichtbaren Freisetzung von Enzymaktivität. Bei Überlebenszeiten bis zu einer Stunde traten als neue Gesichtspunkte auch Aktivitätsfreisetzungen um die Gefäße hinzu und eine nur noch schattenhafte Darstellung der Perikarya im Blutungsbereich. Kompressionsformen oder ähnliche Veränderungen konnten wir nicht beobachten, zumindest nicht so deutlich und klar wie in der Kresylechtfärbung.

Nach mehr als einer Stunde waren die beschriebenen Enzymaustritte auch um die Nervenzellen außerhalb der Blutungen erkenn-

bar. Ab der 2. Stunde waren in allen Fällen abgeschwächt anfärbbare Randsäume um die Blutungen ausgebildet, in einem Fall schon über die Blutung hinausreichend. Nach mehr als 6 Stunden waren erstmals die Perikarya in der Blutung nicht mehr anfärbbar.

Sehr auffällig war die zeitliche Abgrenzung des Beginns der Aktivitätszunahme der Astrocyten. Sie war nach genau 4 1/2 Tagen festzulegen, denn in mehreren Präparaten mit 4 Tagen Überlebenszeit war noch keine Aktivitätssteigerung vorhanden. In der gleichen Gruppe mit 4 - 6 Tagen Überlebenszeit traten bereits Randwallbildungen mit gesteigerter Aktivität und gewucherten Gefäßen auf. Das korreliert in etwa mit den Ergebnissen aus der Literatur nach experimentell-traumatischen Schäden anderer Art, zeigt aber eine klarere zeitliche Abstufung. Im weiteren Verlauf waren dann nur noch quantitative Verschiebungen erkennbar.

4.4. Die beiden hier untersuchten Enzyme zeigten deutliche Veränderungen, die zeitlich recht gut abgrenzbar waren. Sie stellten also auf jeden Fall eine Bereicherung der routinehistologischen Möglichkeiten dar. Der Nachteil liegt darin, daß die Routinehistologie am fixierten Material nach praktisch beliebig langer Lagerung erfolgen kann, während die Enzymhistochemie eine sofortige Bearbeitung erfordert. Die Stabilität der Enzyme ist nach unseren Erfahrungen nur bis zu maximal 48 Stunden postmortal gegeben. Die Mehrzahl der Obduktionen findet zwar in diesem Zeitraum statt, ein größerer zeitlicher Spielraum wäre jedoch wünschenswert gewesen, läßt sich mit der Enzymhistochemie wegen des Auftretens von Artefakten jedoch nicht erreichen. Auch ist der apparative Aufwand und die benötigte Erfahrung bedeutend größer.

Die Altersbestimmung von Verletzungen für rechtsmedizinische Anwendung erfordert klare zeitliche Eckwerte für das erste Auftreten von Veränderungen sowie für den spätesten Zeitpunkt des Fehlens dieser Veränderungen. Eine subjektive Deutung muß nach Möglichkeit verhindert werden. Die Veränderungen in der Enzym-

histochemie beruhen im Wesentlichen auf einer Zunahme oder Abnahme der Färbeintensität, die mit dem Auge erfaßt wird und dadurch nicht so klar quantitativ beurteilt werden kann, so daß eine subjektive Urteilskomponente nicht auszuschließen ist. Auch eine Fotodokumentation mit der Möglichkeit gleichzeitiger Betrachtung und Urteilsbildung durch mehrere Personen wäre wegen Belichtungsunterschieden und Filmemulsionsdifferenzen nicht ausreichend, wohl aber zu aufwendig. Die Routinehistologie erfaßt alle Grundgewebsarten des Gehirns mit Ausnahme vielleicht des Neuropils und bringt vor allem qualitative Veränderungen, meist nach dem Ja-Nein Prinzip und erlaubt in der Regel eine Aussage mit der in foro erforderlichen Sicherheit.

4.5. Die Enzymhistochemie sollte jedoch nicht unter konkurrierenden, sondern ergänzenden Gesichtspunkten zusätzlich erprobt werden. Sie sollte bei entsprechender technischer Einrichtung und praktischer Erfahrung und bei gezielter Fragestellung durchaus zur Anwendung kommen, insbesondere bei der Beurteilung der vitalen Reaktion. Die beiden hier untersuchten Enzyme eignen sich dazu, eine Erweiterung bezüglich der NADPD scheint sinnvoll, insbesondere wegen der Darstellung der Mikroglia und der frühen reparativen Aktivitätssteigerung. Eine Bedeutung wie bei der Wundaltersbestimmung an der Haut kann die Enzymhistochemie nicht erlangen, da das Hirngewebe mit vielfältigen und rascher eintretenden Schädigungsmustern auf ein Trauma reagiert.

Zur praktischen Anwendung wurden signifikante Veränderungen in 2 Tabellen zusammengefaßt, die zusammen mit anderen Tabellen (Histologie, LDH, uE, sPh, aPh) und Kombination aller Aspekte die Altersbestimmung von Rindenprellungsherden mit einem Mass an Sicherheit ermöglichen, das vernünftige Zweifel ausschließt und damit den Anforderungen an die Aussagesicherheit im Rechtsleben entspricht.

S D H

	Erstes Auftreten	Stetiges Auftreten
Abgeschwächte Anfärbung im Neuropil um Blutungen	sofortiger Tod (bei infiltrie- render Blutung)	4 - 6 Std.
Abgeschwächte Anfärbung in der periphersten Molekularschicht	sofortiger Tod	-
Abgeblasste Nervenzellen in der Blutung	1 - 2 Std.	-
Blass angefärbte Nerven- zellen im Randsaum der Blutung	4 - 6 Std.	-
Schwund der Nervenzellen im Blutungsbereich	4 - 6 Std.	6 - 13 Std.
Schwund der Nervenzellen im Randsaum	2 - 4 Tage	4 - 6 Tage
Randwallbildung mit tropfiger Enzym- aktivität	6 - 15 Tage	-

N A D D

	Erstes Auftreten	Stetiges Auftreten
Abgeschwächte Anfärbung im Neuropil um Blutungen	sofortiger Tod	2 - 4 Std.
Axonabrisse	sofortiger Tod	-
Freisetzung granulärer Enzymaktivität	sofortiger Tod	-
Abgeschwächte periphere Molekularschicht	sofortiger Tod	-
Abgeschwächte Nerven- zellen in der Blutung	2 - 4 Std.	4 - 6 Std.
Abgeschwächte Nerven- zellen im Randsaum	2 - 4 Std.	-
Schwund der Nerven- zellen im Blutungs- bereich	4 - 6 Std.	6 - 13 Tage
Schwund der Nerven- zellen im Randsaum	4 - 6 Tage	-
Blasse Anfärbung der Gefäße	6 - 13 Std.	-
Schwund der Anfärbung von Gefäßen	2. - 4. Tag	-
Aktivitätszunahme in den Astrozyten	4 1/2 Tage	-
Randwallbildung	4. - 6 Tag	6. - 15. Tag

LITERATURVERZEICHNIS

1. ARNOLD, M.:
Histochemie: Einführung in Grundlagen und Prinzipien der
Methode
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1968
2. BARKA, T. und P.J. ANDERSON:
Histochemistry: Theory, practice and bibliography
Harper and Row, New York, 1963
3. CHASON, J.L.:
Enzymhistochemistry in postmortem nervous system,
in: Neuropathology - Methods and Diagnosis
4. COIMBRA, A.:
Nerve cell changes in the experimental occlusion of the
middle cerebral artery
Acta neuropath. 3, 547, 1964
5. COLMANT, H.J.:
Zerebrale Hypoxie
Thieme Verlag, Stuttgart, 1965
6. FISCHER, H. und W. SPANN:
Pathologie des Trauma
Bergmann-Verlag, München, 1967
7. FRIEDE, R.L.:
Topographic Brain Chemistry
Academic Press, New York-London, 1966
8. FRIEDE, R.L.:
The cytochemistry of normal and reactive astrocytes
J. Neuropath. Exp. Neurol. 21, 471, 1962
9. GOMORI, G.:
Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 42, 23, 1939

10. GREENFIELD's Neuropathology:
Ed.W. Blackwood, J.A.N. Corsellis,
3. Aufl., Arnold, London 1976
11. Handbuch der Histochemie:
Hrsg. W. Graumann und K.H. Neumann
Fischer-Verl., Stuttgart, 1958 - 1977 ff.
12. KIENE, S. und J. KÜLZ:
Schwere cranio-zerebrale Verletzungen im Kindesalter, Früh-
verlauf und Endresultate aus chirurgischer Sicht
Bruns. Beitr. 210, 224, 1965
13. KOZIK, M.:
Histochemistry of neuronal degenerative changes
J. Hirnf. 16, 351, 1975
14. KRAULAND, W.:
Über die Zeitbestimmung von Schädelhirnverletzungen
Beitr. gerichtl. Med. 30, 226, 1973
15. KREUTZBERG, G.W. und G. PETERS:
Enzymhistochemische Beobachtungen beim experiment. Hirn-
trauma der Ratte
Extrait du Livre jubilaire du Dr. Ludo van Bogaert 1962
16. KREUTZBERG, G.W. und P. SCHUBERT:
Zytochemie der Mikrogliazelle
unveröffentl. Vortragsmanuskript
17. KREUTZBERG, G.W.:
Aspekte der Zellbiologie und Zellpathologie des Neurons
Äsopus-Verl., Lugano-München-Milano 1975
18. LAZARUS, S.S. u.a.:
Enzyme localization in rabbit cerebellum and effect of
post mortem autolysis
J. Neurochemistry 9, 227, 1962
19. LISON, L.:
Histochimie et Cytochimie animales
Paris, Gauthiers-Villars, 1960

20. LOJDA, Z., R. GOSSRAU und F.H. SCHIEBLER:
Enzymhistochemische Methoden
Springer-Verl., Berlin-Heidelberg-New York 1976
21. NAEVE, W. und H.W. BAUSE:
Experimentelle postmortale Kopf- und Hirnverletzungen
Z. ges. gerichtl. Med. 74, 187, 1974
22. PEARSE, A.G.E.:
Histochemistry theoretical and applied
Churchill-Livingstone, London 1972
23. PETERS, G.:
Die gedeckten Gehirn- und Rückenmarksverletzungen in:
Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und
Histologie, Bd. XIII, 3
Hrsg. W. Scholz, Springer Verl., Berlin-Heidelberg-New York
1955
24. PETERS, G.:
Klinische Neuropathologie
Thieme-Verl., Stuttgart 1970
25. PETERS, G.:
Die Hirnverletzungen, in: Neuro-Traumatologie, Bd. I,
Hrsg. F. Kessel, L. Guttmann und G. Maurer
Urban und Schwarzenberg, München 1969
26. PIOCH, W.:
Die histochemische Untersuchung thermischer Hautschäden
und ihre Bedeutung für die forensische Praxis
Bd. 5 der Arbeitsmethoden der medizinischen und natur-
wissenschaftlichen Kriminalistik,
Schmidt-Römhild Lübeck 1966
Hrsg. E. Weinig und St. Berg
27. RAEKALLIO, J.:
Die Altersbestimmung mechanisch bedingter Hautwunden mit
enzymhistochemischen Methoden in: Arbeitsmethoden der med.
und naturwissenschaftlichen Kriminalistik
Schmidt-Römhild, Lübeck 1965

28. RAND, C.W. and C.B. COURVILLE:
Histologic studies in the brain in cases of fatal injury
to the head. VII. Alternations in nerve cells
Arch. Neurol. Psychiat. 55, 79, 1946
29. RUBINSTEIN, L.J., KLATZO, J. and MIQUEL:
Histochemical observations on oxidative enzyme activity
of glial cells in a local brain injury
J. Neuropath. exp. Neurol. 21, 116, 1962
30. SELIER, K. und F. UNTERHARNSCHEIDT:
Mechanik und Pathomorphologie der Hirnschäden nach
stumpfer Gewalteinwirkung auf den Schädel
Hefte z. Unfallheilk. 76, 1963
31. SHIMIZU, N. and H. YORIAKI
Deposition of glycogen and changes in some enzymes in
brain wounds
Nature, 181, 781, 1958
32. SPATZ, H.:
Von der Morphologie der Gehirnkontusionen (besonders der
Rindenprellungsherde)
Münch. Med. Wschr. 93, 1, 1951
33. SPECTOR, R.C.:
Cerebral succinic-dehydrogenase, cyto-chrome-oxidase and
mono-amine-oxidase activity in experimental anoxic-ischaemic
brain damage
Brit. J. exp. Path. 44, 251, 1963
34. SPECTOR, R.C.:
Selective changes in dehydrogenase enzymes and pyridine
nucleotides in rat brain in anoxic-ischaemic encephalopathy
Brit. J. exp. Path. 44, 312, 1963
35. THOMAS, E. and A.G.E. PEARSE:
Histochemical demonstration of damage resistant nerve cells
with a TPN-Diaphorase reaction
Acta neuropath. 3, 238, 1964

36. TYRER, J.H.:
The post-mortem stability of certain oxidative enzymes in
brain and spinal cord
Histochemistry 27, 21, 1971

37. UNTERHARNSCHEIDT, F.J.:
Die traumatischen Hirnschäden Mechanogenese, Pathomorphologie und Klinik
Z. Rechtsmed. 71, 153, 1972

38. WALCHER, K.:
Über vitale Reaktionen
Dtsch. Z. ges. ger. Med. 15, 16, 1930

39. WELTE, E.:
Über die Zusammenhänge zwischen anatomischem Befund und
klinischem Bild bei Rindenprellungsherden nach stumpem
Schädeltrauma
Arch. Psych. Nervenkr. 179, 243, 1948

40. WILLE, R., EBERT, M. und M. CORNELY:
Zeitstudien über Hämosiderin
Arch. Kriminol. 144, 28 und 107, 1969

41. WINCKLER, J.:
Verwendung gefriergetrockneter Kryostatschnitte für
histologische und histochemische Untersuchungen
Histochemistry, 24, 168, 1970

42. ZOLLINGER, H.-U.:
Pathologische Anatomie, Bd. I: Allgemeine Pathologie
Thieme-Verl. Stuttgart 1969

LEBENS LAUF

Am 24.7.49 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Georg Gilg und seiner Ehefrau Annemarie Gilg, geb. Sopp in München geboren.

Von 1955 bis 1959 besuchte ich die Volksschule in München-Solln, wechselte dann auf das Wittelsbacher Gymnasium in München über und schloß dort 1968 mit dem Abitur ab. 1968 bis 1969 studierte ich 2 Semester Physik an der TU München. Von Oktober 1969 bis März 1971 leistete ich 18 Monate Wehrdienst ab. Von März 1971 bis Oktober 1971 studierte ich 1 Semester Betriebswirtschaft. Im Oktober 1971 nahm ich das Medizinstudium an der UNI München auf und schloß im Oktober 1978 mit der Approbation ab.
Familienstand: ledig

